



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultat de **M**edicina i **O**dontologia

TESIS DOCTORAL

**VALORACIÓN DEL ESTADO PERIODONTAL, PERFIL
INFLAMATORIO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN
PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**

Presentada por: Cecilia Fabiana Márquez Arrico

Dirigida por: Dr. Francisco Javier Silvestre Donat

Dra. Milagros Rocha Barajas



Valencia, octubre 2022



Hospital Universitari
Doctor Peset

Programa de Doctorado en Odontología

Formación de Profesorado Universitario - FPU18/00854



Fundació
Fisabio



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

VALORACIÓN DEL ESTADO PERIODONTAL,
PERFIL INFLAMATORIO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL
EN PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología
Programa de Doctorado en Odontología
Código 3143, RD 99/2011

Doctoranda: Cecilia Fabiana Márquez Arrico

Grado en Odontología por la Universitat de València (UV)
Máster Universitario en Ciencias Odontológicas UV
Diploma de Especialización Médico-Quirúrgica y Hospitalaria (UV)
Certificado de Investigación Clínica en Pacientes Especiales (UV)

Directores:

Prof. Dr. Francisco Javier Silvestre Donat

Catedrático del Departamento de Estomatología
Universitat de València

Dra. Milagros Rocha Barajas

Investigadora Senior de FISABIO
Hospital Universitario Doctor Peset de Valencia

Con la colaboración de:

Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia
Unidad de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo (FISABIO)
Ministerio de Innovación, Ciencia y Universidades (FPU18/00854)

Valencia, octubre 2022

INFORME DIRECTORES/AS Y TUTOR/A PARA DEPÓSITO DE TESIS

Director (es) / Codirector (es):

1.- Apellidos y nombre: **Francisco Javier Silvestre Donat** N.I.F. 22661480V

Departamento/Instituto: Universidad de Valencia, Centro: Departamento de Estomatología.

2.- Apellidos y nombre: **Milagros Rocha Barajas** N.I.F. 50191388Y

Departamento/Instituto: Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO), Centro: Unidad de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo, Hospital Universitario Dr. Peset.

Tutor

Apellidos y nombre: **Francisco Javier Silvestre Donat** N.I.F. 22661480V

Departamento/Instituto: Universidad de Valencia, Centro: Departamento de Estomatología.

Directores/as y tutor/a, respectivamente, de la tesis doctoral: **"VALORACIÓN DEL ESTADO PERIODONTAL, PERFIL INFLAMATORIO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO"**

de D/Dña. **Cecilia Fabiana Márquez,**

estudiante del Programa de Doctorado **3143 Odontología** (RD 99/2011) de la Universitat de València, emiten informe **FAVORABLE** para la realización del depósito y la defensa de la tesis doctoral.

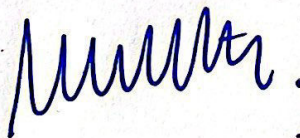
Fecha:

14 de OCTUBRE DE 2022

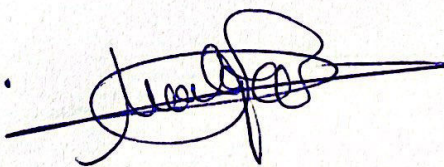
Fdo.: Francisco Javier Silvestre Donat

Fdo.: Milagros Rocha Barajas

Fdo.: Francisco Javier Silvestre Donat



Director



Directora



Tutor

**ESCOLA DE DOCTORAT
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

AGRADECIMIENTOS

Aunque este apartado no conlleva normas concretas, creo que es uno de los más complejos, porque conseguir resumir lo agradecida que estoy con todas las personas que contribuyeron en esta Tesis Doctoral y en esta gran etapa de mi vida, no es fácil.

Empezaré con mis directores, el Dr. Francisco Javier Silvestre Donat y la Dra. Milagros Rocha Barajas. Ambos, confiaron en mí desde el principio, dándome esta oportunidad de iniciarme en el área de la investigación. Me han estado apoyando en este camino, que ha tenido grandes baches, entre ellos la pandemia, etapa en la que las llamadas y los mensajes te daban ánimos, esperanza y te recordaban que la Tesis se retomaría pronto y todo volvería a la normalidad. Gracias a los dos por acompañarme en este camino y por enriquecerme con su experiencia profesional.

Al Dr. José María Montiel, con quien él inicié mis primeros pasitos en la investigación, siendo director de mi trabajo de fin de grado y de fin de máster. Gracias por enseñarme amplios conocimientos en bioestadística, por ayudarme con el análisis estadístico de esta Tesis Doctoral y por estar siempre disponible.

Pero nada de esto tendría sentido, sin el apoyo de mi familia. Les agradezco todas esas horas de conversación sobre el Síndrome de Ovario Poliquístico y las enfermedades periodontales y por escuchar mis preocupaciones por las publicaciones pendientes y demás dramas clásicos de una auténtica doctoranda. Mi padre, ahora es un experto en periodoncia, incluso a veces me sorprende con ideas como: "Mira!, de esto se podría hacer una Tesis" y mi madre, que es enfermera, les informa a sus pacientes de nefrología los cuidados bucodentales que deben tener. Gracias a mis padres, por el esfuerzo que han hecho dándome todas estas oportunidades, por brindarme estos valores, esta educación, y este apoyo incondicional.

A mi hermana Julia, quién además de ser mi mejor amiga, ha sido siempre mi ejemplo a seguir, le agradezco su amor, su paciencia y su confianza en mí. Fue la primera Doctora de la familia y ver en ella como se realizó como docente de la Universidad de Barcelona, fue una alegría y un gran orgullo. Julia siempre ha sido mi apoyo, mi consejera y mi psicóloga de cabecera y por ello también te admiro ja, ja, ja. Y cómo olvidarme de mi cuñado Fernando, siempre te agradeceré el haber estado ahí para todo y tu confianza en mí como tu odontóloga preferida.

A mi pareja Miguel, le agradezco la paciencia que ha tenido durante estos 3 años. Él también es un experto en odontología, ¡ha pasado de no querer saber nada de odontología, a poder identificar el patrón de crecimiento facial! Gracias, por el amor, la amistad, y las risas que me han dado un empujoncito cuando lo necesitaba.

Además, me gustaría agradecerles a mis sobrinos Pablo y Mateo, por esas sonrisas que te sacan todos los males, y a mis primos Marcelo y Jessica, por esos viernes de pizza y Netflix que te llenan de paz. Gracias a mi familia, a mis amigos y amigas, por estar siempre ahí, por confiar en mí, y por decirme cada día que lo conseguiría.

A FISABIO, en especial a mis compañeros de la Unidad de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo; destacando la dedicación de Rosa, Zaida y Mey, a quienes agradezco su tiempo y esfuerzo en el procesamiento de las muestras de estas Tesis Doctoral. Gracias, por enseñarme los experimentos y las técnicas de laboratorio, y por su excelente trabajo.

A mis compañeros y compañeras del servicio de Odontoestomatología del Hospital Universitario Dr. Peset, donde desarrollé esta Tesis Doctoral, y con quienes compartí estos últimos 4 años. En especial, a mis compañeras de profesión la Dra. Llanos González y la Dra. María Dolores Viguer, quienes facilitaron la realización de esta Tesis y quienes compartieron conmigo toda su experiencia profesional. También a las alumnas y alumnos del Diploma de Especialización en Odontología Médico-quirúrgica y Hospitalaria, por su ayuda y por su grata compañía. Por otro lado, agradezco al Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario Dr. Peset, en especial al Dr. Carlos Morillas y a la enfermera Begoña por su gran esfuerzo.

A Universitat de València, le agradezco la atención brindada, en especial al personal del Departamento de Estomatología, por el trato cercano en las gestiones necesarias en el desarrollo de esta Tesis Doctoral. Agradezco también al Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, la financiación recibida, mediante el Programa de Formación de Profesores universitarios FPU que se me concedió.

Y, por último, ¡¡¡a mis pacientes!!!; sin ellas nada de esto hubiera sido posible. Durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral, también aprendí otras cosas que no son exactamente de odontología, pero son importantes: el trabajo en equipo, la empatía y la perseverancia. Herramientas, que además de ser útiles en el trabajo, te sirven para no perder de vista tu objetivo como sanitario; ayudar a los pacientes.

“Persevera y triunfarás”

-Séneca-

ÍNDICE

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
Concepto de salud periodontal	5
Anatomía periodontal	5
Criterios de salud periodontal	7
Gingivitis inducida por placa	9
Gingivitis no asociadas a placa bacteriana y otras alteraciones gingivales	10
Periodontitis	11
Tipos de periodontitis, clasificación	11
Patogénesis de la enfermedad periodontal	19
Respuesta inmune - inflamación y estrés oxidativo -	23
Tratamiento periodontal	30
Asociación entre periodontitis y enfermedad cardiometabólica	35
- obesidad y aterosclerosis –	35
Síndrome de ovario poliquístico	41
Concepto y diagnóstico	41
Epidemiología	43
Bases patogénicas y fisiopatología.....	44
Manifestaciones clínicas	53
Inflamación crónica de bajo grado, estrés oxidativo y riesgo CV	55
Tratamiento y manejo del PCOS	57
Síndrome de ovario poliquístico y enfermedad periodontal	63
JUSTIFICACIÓN.....	69
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	70
MATERIAL Y MÉTODOS.....	71
Diseño del estudio	71
Análisis estadístico:	85
Calculo del tamaño muestral.....	85
Pruebas estadísticas.....	85
RESULTADOS	87
Estadística descriptiva del grupo PCOS y control	87
Características sociodemográficas	87
Historia clínica y medicación recibida	87
Antropometría y tensión arterial	88
Hábitos de higiene oral, tabaquismo y alcohol	88
Bioquímica y hormonas sexuales	91
Objetivo 1: Valoración del estado periodontal	93
Objetivo 2: Influencia de los hábitos de higiene oral, tabaquismo y alcohol sobre el estado periodontal de los grupos	96
Objetivo 3: Asociación entre la toma de medicación, el estado periodontal y el grupo	98
Objetivo 4.....	100
4.1 Asociación entre la antropometría, el estado periodontal y el grupo	100

4.2 Asociación entre los parámetros bioquímicos, el estado periodontal y el grupo	104
4.3 Asociación de hormonas sexuales, el estado periodontal y el grupo	110
Objetivo 5.....	113
Características de la subpoblación	113
5.1 Cuantificación sistémica de proteínas proinflamatorias: MPO, IL6 y TNF α	116
Asociación entre la toma de medicación y los marcadores inflamatorios	116
Asociación entre proteínas inflamatorias, los parámetros periodontales y la presencia de gingivitis.....	117
Asociación entre proteínas inflamatorias y los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo.....	120
5.2 Cuantificación de MCP1 y de las proteínas implicadas en la activación del inflamasoma NLRP3: JNK y NF κ B (en monocitos y linfocitos).....	125
Asociación entre las proteínas inflamatorias determinadas mediante Western blot y la toma de medicación	125
Asociación entre las proteínas inflamatorias determinadas mediante Western blot, los parámetros periodontales, la presencia de gingivitis y el grupo	126
Asociación entre las proteínas inflamatorias cuantificadas mediante Western blot, los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo	129
Objetivo 6: Disfunción endotelial –interacción leucocito-endotelio y moléculas de adhesión-	133
6.1 Interacción leucocito-endotelio	133
Asociación entre la toma de medicación y la interacción leucocito endotelio	133
Asociación de la interacción leucocito-endotelio con los parámetros periodontales, la presencia de gingivitis y el grupo	134
Asociación de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio con los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo.....	139
6.2 Moléculas de adhesión: sICAM y sVCAM	145
Asociación entre la toma de medicación y las moléculas de adhesión	145
Asociación entre el estado periodontal y las moléculas de adhesión	146
Asociación entre las moléculas de adhesión y los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo	149
DISCUSIÓN.....	153
Limitaciones y fortalezas del estudio	168
CONCLUSIONES.....	170
BIBLIOGRAFÍA.....	173
ANEXOS.....	191
1.1. Consentimiento informado, compromiso de confidencialidad y hoja de información al paciente.	191
1.2. Certificado de la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Dr. Peset para la realización de esta Tesis Doctoral.....	194
2.1. Recogida de las variables periodontales por medio del periodontograma.	197
2.2. Ficha de historia clínica, recogida de datos para la antropometría y tensión arterial y cuestionario de hábitos de higiene oral, tabaquismo y consumo de alcohol.	198
2.3. Ficha de datos bioquímicos, hormonas sexuales, citoquinas proinflamatorias y parámetros de disfunción endotelial.	200
3. Otros méritos durante la formación del doctorado.	201

Índice de figuras

Figura 1. Concepto de inflamofilia y PDs.	3
Figura 2. Anatomía del periodonto.	6
Figura 3. Modelo contemporáneo de interacciones huésped-microbiota oral en la patogénesis de las PDs.	19
Figura 4. Papel del sistema inmune en la patogénesis de las PDs y su consecuente proceso de inflamación crónica. Las células de la inmunidad innata son atraídas al sitio de lesión para destruir los microorganismos patógenos.	26
Figura 5. Modelo de asociación entre obesidad, periodontitis y disfunción endotelial. La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar periodontitis, que tiende a ser más pronunciada en presencia de RI asociada.	40
Figura 6. Proceso de ovulación normal en el ovario vs fallo en la selección del folículo a madurar en la ovulación, generándose la presencia de múltiples folículos maduros que generan quistes visibles en una exploración ecográfica.	41
Figura 7. Alteración central causante de anovulación, por exceso de producción de GnRH a nivel hipotalámico.	45
Figura 8. Ciclo menstrual, cambios hormonales y epiteliales en sus diferentes etapas y órganos implicados.	46
Figura 9. Epitelios secretores de hormonas a nivel ovárico.	47
Figura 10. Resumen de las bases patogénicas, fisiopatología y principales alteraciones hormonales en PCOS.	52
Figura 11. Mecanismos patogénicos que vinculan el PCOS y la periodontitis.	63
Figura 12. Diagrama del flujo llevado a cabo para el reclutamiento de las pacientes.	73
Figura 13. Distribución de la población de estudio según el estado periodontal acorde a la clasificación actual.	93
Figura 14. Regresiones lineales simples el BOP, CAL y PPD con el BMI.	102
Figura 15. Regresiones lineales siendo la variable dependiente cada parámetro periodontal y la independiente la insulina.	107
Figura 16. Regresiones lineales siendo la variable dependiente el BOP y la independiente los triglicéridos y el HDLc.	108
Figura 17. Árbol de clasificación CHAID exhaustivo.	112

Figura 18. Valores promedio de TNF α , IL6 y MPO en el grupo control, PCOS periodontalmente sanas y PCOS con gingivitis	116
Figura 19. Valores promedio de MCP1, JNK y NF κ B según el grupo	125
Figura 20. Valores promedio de velocidad de flujo, flujo de rodamiento y adhesión, teniendo en cuenta 3 grupos: PCOS; PCOS con gingivitis y controles (sin PDs).	133
Figura 21. Representación gráfica de las regresiones lineales simples teniendo en cuenta la pertenencia al grupo PCOS, PCOS con gingivitis y el control	137
Figura 22. Valores promedio de sICAM y sVCAM1 según el grupo y las diferencias significativas tras aplicar el test ANOVA.....	145

Índice de tablas

Tabla 1. Criterios diagnósticos de salud gingival y gingivitis inducida por placa.	9
Tabla 2. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas según el “Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Condition.	15
Tabla 3. Estadios de periodontitis que determinan la severidad de la periodontitis y la complejidad en el manejo de la enfermedad.	17
Tabla 4. Grados de periodontitis, según características biológicas, ratio de progresión y evaluación del riesgo.	18
Tabla 5. Análisis descriptivo de los parámetros sociodemográficos, medicación, hábitos de higiene oral, hábitos tóxicos, antropometría y la tensión arterial.	89
Tabla 6. Análisis descriptivo e inferencial de las variables bioquímicas y hormonas sexuales comparando el grupo PCOS con el grupo control.	91
Tabla 7. Análisis descriptivo e inferencial del estado periodontal con respecto al grupo PCOS y control.	95
Tabla 8. Regresión logística binaria siendo la variable dependiente la presencia de PDs y las variables independientes la higiene oral y el grupo.	97
Tabla 9. Regresión logística binaria introduciendo como variable dependiente el grupo PCOS o control con el método de entrar.	99
Tabla 10. Regresión logística binaria siendo la variable dependiente la presencia de PDs, utilizando el método de entrar.	99
Tabla 11. Correlaciones bivariadas de Spearman entre los parámetros periodontales y los parámetros antropométricos.	101
Tabla 12. Regresión logística binaria siendo la variable dependiente la presencia de PDs y las variables independientes el BMI y el grupo.	103
Tabla 13. Correlaciones bivariadas de Spearman entre las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs y los parámetros periodontales.	105
Tabla 14. Modelo de regresión logística binaria introduciendo como variable dependiente el grupo (PCOS o control) y como independientes las variables bioquímicas que mostraron diferencias significativas entre los grupos.	109

Tabla 15. Modelo regresión logística binaria, siendo la variable dependiente presencia/ausencia de PDs y las variables independientes los parámetros bioquímicos y el grupo.	110
Tabla 16. Correlaciones bivariadas de Spearman entre el estradiol y la 17OH-progesterona con los parámetros periodontales.	111
Tabla 17. Regresión logística binaria con el grupo PCOS como variable dependiente y como variables independientes el estradiol y la 17-OH progesterona.	111
Tabla 18. Estadística descriptiva de la subpoblación diferenciando la muestra en 3 grupos: PCOS, PCOS con gingivitis y controles (sin ningún tipo de PDs).	114
Tabla 19. Correlaciones bivariadas de Spearman entre los parámetros periodontales, las proteínas inflamatorias y MPO.....	117
Tabla 20. Valores promedio de proteínas inflamatorias según la presencia/ausencia de gingivitis.	118
Tabla 21. Regresiones lineales simples introduciendo como la variable dependiente cada uno de los parámetros periodontales (que se correlacionaron con alguna de las proteínas inflamatorias) y como variables independientes las proteínas que se correlacionaron de forma estadísticamente significativa.	119
Tabla 22. Modelo de regresión multinominal siendo la variable dependiente el grupo y las independientes las proteínas inflamatorias.	120
Tabla 23. Correlaciones bivariadas entre los parámetros inflamatorios y las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs (que mostraron diferencias significativas entre los grupos).	121
Tabla 24. Correlaciones significativas entre las variables bioquímicas no asociadas a la presencia de PDs, pero que mostraron correlaciones significativas con algunas de las proteínas inflamatorias.	122
Tabla 25. Correlaciones bivariadas de Spearman entre las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre los grupos, los marcadores inflamatorios y la MPO.....	123
Tabla 26. Regresiones lineales siendo la variable dependiente cada proteína inflamatoria y las moléculas de adhesión y como las independientes los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales con las que se obtuvo correlación estadísticamente significativa.	124

Tabla 27. Correlaciones bivariadas de entre las proteínas inflamatorias obtenidas con el Western blot y los parámetros periodontales.	126
Tabla 28. Valores promedio de las proteínas inflamatorias obtenidas en el Western blot según la presencia/ausencia de gingivitis.....	127
Tabla 29. Regresiones lineales significativas siendo la variable dependiente cada una de las proteínas inflamatorias y las independientes los parámetros periodontales.	128
Tabla 30. Modelo de regresión multinominal, introduciendo como variable dependiente el grupo y como independientes las proteínas inflamatorias obtenidas con el wester blot.....	129
Tabla 31. Correlaciones bivariadas entre las proteínas inflamatorias obtenidas con el Western blot y las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs.	130
Tabla 32. Correlaciones bivariadas entre las proteínas inflamatorias y las hormonas sexuales que mostraron diferencias entre los grupos.	131
Tabla 33. Regresiones lineales simples entre las proteínas inflamatorias obtenidas con Western blot (como variables dependientes) y los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales (como variables independientes) que mostraron correlaciones significativas.	132
Tabla 34. Correlaciones bivariadas entre los parámetros periodontales y la velocidad de flujo, el flujo de rodamiento y la adhesión, teniendo en cuenta el grupo.....	134
Tabla 35. Valores de la interacción leucocito endotelio según la presencia/ausencia de gingivitis.....	135
Tabla 36. Modelos de regresiones lineales simples, introduciendo en el modelo como variable dependiente cada parámetro de la interacción leucocito endotelial y como variable independiente el BOP.	136
Tabla 37. Modelos de regresiones lineales simples, siendo la variable dependiente cada uno de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio y como independientes la presencia de gingivitis y el grupo.....	139
Tabla 38. Modelo de regresión logística multinominal, siendo la variable dependiente el grupo y las independientes los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelio.	138
Tabla 39. Correlaciones bivariadas entre los parámetros bioquímicos (que mostraron diferencias significativas entre los grupos y que se asociaron a la presencia de PDs) y los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelio.....	139

Tabla 40. Correlaciones bivariadas entre los restantes parámetros bioquímicos (no asociados a la presencia de PDs) y los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelio, que mostraron resultados estadísticamente significativos.	140
Tabla 41. Correlaciones bivariadas entre las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre los grupos y los parámetros de la interacción leucocito-endotelio.	140
Tabla 42. Modelos de regresiones lineales simples siendo la variable dependiente cada uno de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio y las independientes los parámetros bioquímicos y hormonas sexuales con los que se encontraron correlaciones estadísticamente significativas.	142
Tabla 43. Valores promedio de moléculas de adhesión según el estado periodontal.	146
Tabla 44. Correlaciones bivariadas entre las moléculas de adhesión y los parámetros periodontales.	147
Tabla 45. Regresiones lineales simples introduciendo como la variable dependiente el BOP y como independiente la sICAM.	148
Tabla 46. Modelo de regresión multinomial, siendo la variable dependiente el grupo y las variables independientes las moléculas de adhesión.	148
Tabla 47. Correlaciones bivariadas entre las moléculas de adhesión y las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs.	149
Tabla 48. Correlaciones entre la sICAM1 con los parámetros bioquímicos no asociados a la presencia de PDs, que mostraron resultados estadísticamente significativos.	150
Tabla 49. Correlaciones bivariadas de Spearman entre las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre los grupos, y moléculas de adhesión obtenidas con el Luminex®.	151
Tabla 50. Regresiones lineales siendo la variable dependiente cada molécula de adhesión y como las independientes los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales con las que se obtuvo correlación estadísticamente significativa.	152

Abreviaturas y siglas

A

- A1c: hemoglobina glicosilada.
- AAP: Academia Americana de Periodontología.
- ACE: Colegio Americano de Endocrinología.
- ACTH: hormona adenocorticotropa.
- ACTR: receptor activador.
- AE-PCOS: Sociedad del Síndrome de Ovario Poliquístico y Exceso de Andógenos.
- AMH: hormona antimuleriana.
- AMPK: adenosín monofosfato.
- ANOVA: análisis de varianzas.
- ARNIL: ácido ribonucleico no codificante.
- ATP: adenosín trifosfato.

B

- BMI: índice de masa corporal.
- BOP: sangrado al sondaje.
- BPS: bisfenol S.

C

- C3. complemento 3.
- CAL: nivel de inserción clínica.
- CAT:tomografía axial computerizada.
- CBCT: tomografía computerizada de haz cónico.
- CV: cardiovascular.
- CDC: centros de control y prevención enfermedades.
- CHAID: árbol de clasificación logístico exhaustivo.
- cHDL: colesterol de alta densidad.
- cLDL: colesterol de baja densidad.
- COVID19: Enfermedad producida por el Coronavirus-19.
- COX: ciclooxigenasa.
- CRP: proteína c reactiva.
- CYP450: citocromo P 450.

D

- DBP: tensión arterial diastólica.
- DEF1: defensina 1.
- DHEA: dehidroepiandrosterona.
- DHEAS: sulfato dehidroepiandrosterona.
- DHT: dihidrotestosterona.
- DNA: ácido desoxirribonucleico.
- DPCPSI: División de Coordinación, Planificación, Progrmación e Iniciativas estratégicas.

E

- EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.
- ESO: Educación Secundaria Obligatoria.
- ET1: endotelina 1.

F

- FSH: hormona folículoestimulante.
- FP: Formación Profesional.

G

- GCF: fluido crevicular gingival.
- GM-CSF: factor estimulante de colinas de macrófagos.
- Gh: hormona del crecimiento.
- GnRH: hormona liberadora de gonadotropina.

H

- HCG: gonadotropina humana coriónica.
- HDL: lipoproteínas de alta densidad.
- HOMA: modelo homeostático para evaluar insulinoresistencia.
- HUVEC: células endoteliales humanas del cordón umbilical.
- hsCRP: proteína c reactiva ultrasensible.
- HSD: hidroxisteroide deshidrogenasa

I

- IAL: índice androgénico libre.
- ICAM: moléculas de adhesión intercelular.
- Ig: inmunoglobulina.
- IGFB: proteína transportadora del factor de crecimiento insulinosimil.
- IGF: factor de crecimiento insulinosimil.
- IL: interleuquina.
- INHA: subunidad inhibidora alfa.
- INS: genes reguladores de insulina.
- INSL: genes insulinosimiles.
- IR: resistencia a la insulina.
- IRS: sustratos receptores de insulina.

J

- JNK: cinasas c Jun terminal.

L

- LDL: lipoproteína de baja densidad.
- LH: hormona luteinizante.
- LHCGR: receptor de hormona luteinizante.

M

- MAPK: proteína cinasa activada por mitógeno.
- MC4R: receptor de la melanocortina 4
- MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1.
- MMP: metaloproteinasas.
- MPO: mieloperoxidasa.

N

- NIH: Instituto Nacional de Salud EEUU.
- NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa.
- NLRP3: inflamasoma dominio de pirina NLR que contiene 3.
- NO: óxido nítrico.

O

- OB: genes reguladores de la obesidad.
- OBR: receptores de genes OB.
- OC: anticonceptivos orales.
- OR: Odds Ratio.

P

- PAI1: activador tisular de fibrinógeno 1.
- PAMPS: patrones moleculares asociados a daño.
- PDs: enfermedades periodontales.
- PGE: prostaglandina E.
- PPD: profundidad de sondaje.

R

- RNA: ácido ribonucleico.
- RNAm: ácido ribonucleico mensajero.
- RANKL: receptor nuclear del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa.
- RBP4: proteína fijadora de retinol A.
- ROS: especies reactivas de oxígeno.

S

- SBP: tensión arterial sistólica.
- sICAM: moléculas de adhesión intercelular solubles.
- SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales.
- StAR: enzima reguladora de esteroidogénesis.
- SRP: raspado y alisado radicular.
- sVCAM: moléculas de adhesión vascular solubles.

T

- TD1: diabetes mellitus tipo 1.
- TD2: diabetes mellitus tipo 2.
- TLR4: receptor tipo toll 4.
- Th1: linfocitos T colaboradores tipo 1.
- Treg: linfocitos T reguladores.

V

- VCAM: moléculas de adhesión vascular.
- VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.
- VNTR: tramo variable de un gen.

W

- WHR: índice cintura cadera.
- WST: índice cintura talla.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades periodontales (PDs [del inglés, Periodontal Diseases]) son patologías que afectan al periodonto, que está compuesto por la encía, el ligamento periodontal, el cemento radicular y el hueso alveolar. El periodonto, es una unidad funcional encargada del soporte dental en el interior del alveolo, en el hueso alveolar y de la amortiguación y transmisión de las fuerzas oclusales. Además, presenta una función formativa, nutricional y sensorial. En cuanto a la función formativa, es uno de los elementos principales en el remodelado óseo que ocurre durante toda la vida. Participa en la resorción y consiguiente aposición de hueso que ocurre en los movimientos dentales fisiológicos adaptativos a las fuerzas masticatorias y en los movimientos generados con tratamiento ortodóncico. La función nutricional se consigue por el aporte de nutrientes al cemento radicular, hueso alveolar y a la encía, dado que es un tejido altamente vascularizado. Recibe vascularización por medio de capilares del ligamento periodontal, arteriolas alveolares, y arteriolas suprapariólicas mucogingivales. La vascularización se acompaña de la inervación, que le otorga una función sensitiva, por medio de fibras nerviosas sensitivas y autónomas que llegan tanto al ligamento periodontal como a la encía. Las fibras sensitivas transmiten los estímulos recibidos por los nociceptores del ligamento periodontal (receptores sensoriales encargados de recibir y transmitir el estímulo doloroso) y mecanorreceptores (reciben estímulos físicos como la presión sobre el diente). Las fibras autónomas intervienen fundamentalmente sobre el control de los vasos sanguíneos periodontales. En respuesta a los estímulos recibidos, se ejerce una función protectora por medio de la producción y aposición de cemento radicular sobre el diente y formación de hueso alveolar.

Las PDs afectan a los diferentes tejidos que forman parte del periodonto, pudiéndose diferenciar dos grandes grupos: las gingivitis (inflamación superficial) y las periodontitis (destrucción irreversible de los tejidos periodontales). Son patologías infecciosas, causadas por bacterias y su naturaleza de inflamación crónica las ha relacionado con múltiples enfermedades sistémicas (1).

La prevalencia de las PDs se cuantifica según la Organización Mundial de la Salud por rango de edad, determinándose que alrededor del 50% de la población

mundial mayor de 35 años presenta algún tipo de PDs (2,3), siendo la gingivitis más prevalente en los adolescentes (12-15 años) y las periodontitis en los adultos (35-44 años y 65-74 años)(3). La periodontitis afecta aproximadamente al 25% de los adultos, y si no es tratada conlleva serias consecuencias, tales como: edentulismo, movilidad dental, infecciones, maloclusiones, quistes y dolor (4). Se estima que un 15% de la población mundial adulta presenta periodontitis severa (estadios III y IV, con la presencia de bolsas de 5-6 mm)(2).

En España, 8 millones de adultos presentan PDs (1 de cada 3) de los cuales 2 millones desarrollan una periodontitis severa (1 de cada 13 adultos mayores de 40 años). El 33% de los adultos mayores (65-74 años) presenta pérdida dentaria grave (16 dientes ausentes o más) y el 11% son edéntulos por causa periodontal (2-5). Por ello, podemos decir que en general se trata de un grupo de enfermedades con alta prevalencia.

Las periodontitis vienen precedidas de gingivitis, aunque en muchas ocasiones pasen desapercibida por los pacientes. Hay factores que disminuyen la sintomatología, sobre todo el sangrado de encías, como puede ser el tabaco (que produce una vasoconstricción de los capilares que irrigan el ligamento periodontal y la encía). También puede ocurrir que la gingivitis sea leve con acúmulos de placa bacteriana prácticamente imperceptibles, pero que la respuesta del paciente sea exacerbada y exista alta virulencia de las bacterias periodontopatógenas, existiendo una periodontitis que evolucione en corto tiempo (lo que se denominaba periodontitis agresiva).

Se inicia por un acúmulo de placa bacteriana (biofilm dental) con gérmenes periodontopatógenos necesarios, pero no suficientes para que se produzca la enfermedad, siendo necesaria la presencia de un hospedador susceptible (6). Por ello, muchos pacientes presentan biofilm bacteriano en la superficie dental y presentan gingivitis, pero no evolucionan a periodontitis. Al retirar el biofilm dental, se restaura la salud gingival, que se evidencia con la disminución de la inflamación de la encía y desaparición del sangrado gingival. Cuando las bacterias comienzan a depositarse por debajo del margen gingival, contactan con el fondo del surco gingival y comienza a desestructurarse la inserción periodontal; cuando esta situación se mantiene en el tiempo, se genera una destrucción de los tejidos periodontales.

La presencia de biofilms supra- y subgingivales desencadena la activación del sistema inmune del hospedador, primariamente con objetivos protectores, pero que a la larga conlleva a la destrucción de los tejidos periodontales, inducida mediante la síntesis y liberación de citoquinas, mediadores proinflamatorios, metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs [del inglés, Matrix Metalloproteinases]) y mieloperoxidasa (MPO) (7), favoreciendo la cronificación de esta inflamación de bajo grado (8,9). Recientemente, se ha introducido el concepto de inflamofilia en la descripción de la patogenia de las PDs. Consiste en un proceso de retroalimentación en el que las comunidades disbióticas microbianas periodontales ejercen una interacción con el proceso inflamatorio para su perpetuación a través de la adquisición de nutrientes del tejido periodontal destruido (10–12). Este concepto tiene en cuenta factores que influyen como el estado inmunoinflamatorio del huésped susceptible y/o la presencia de patógenos periodontales que pueden inclinar la balanza de una microbiota periodontal simbiótica hacia un estado disbiótico (figura 1).

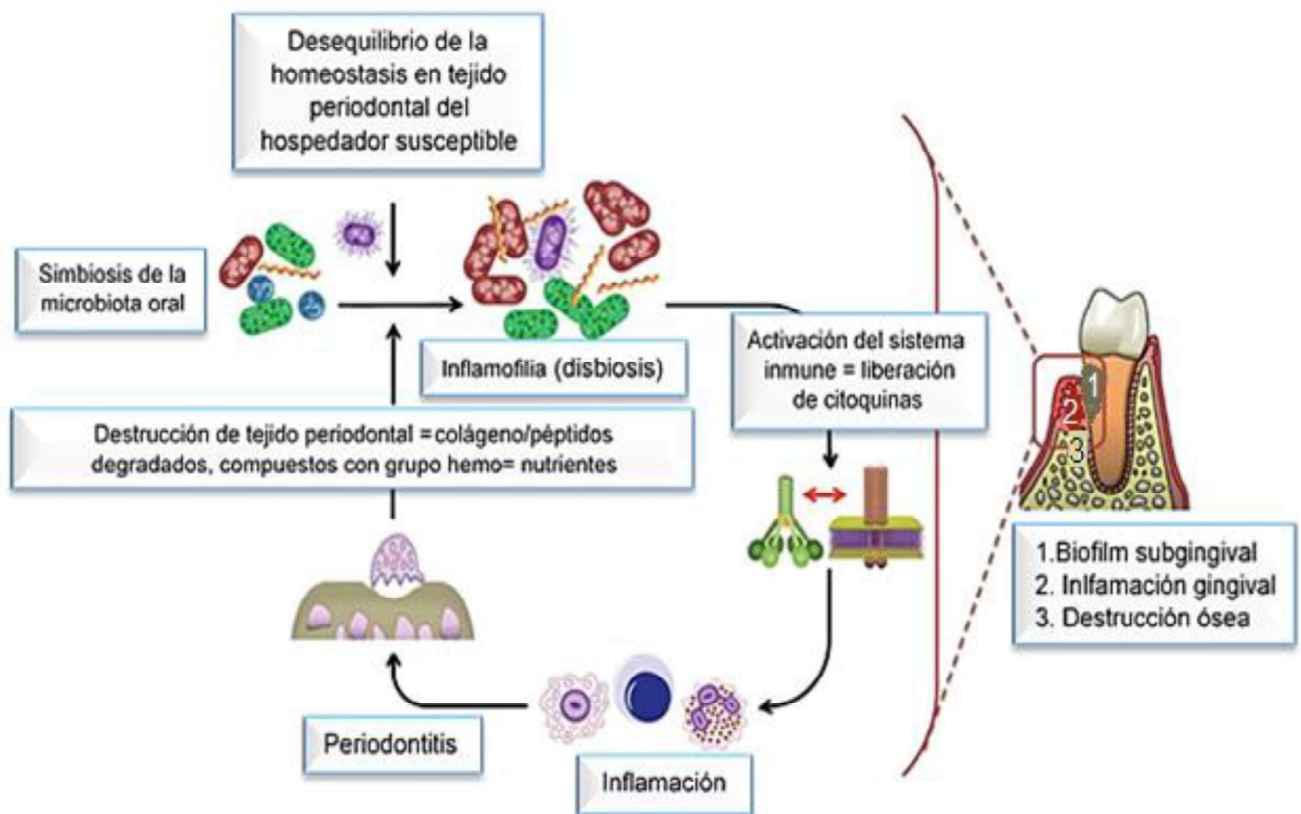


Figura 1. Concepto de inflamofilia y PDs. Fuente: adaptado de Hajishengallis *et al.*, 2014 (10).

La inflamación causada por la microbiota disbiótica periodontal depende en gran parte de la respuesta inmunoinflamatoria del huésped. Inicialmente, se desencadena la activación del eje monocito-linfocito, debido a la penetración bacteriana en los tejidos periodontales. La liberación de citoquinas, prostaglandinas y MMPs mantenida en el tiempo, conduce a la destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar (figura 1).

La descomposición de dichos tejidos proporciona nutrientes para las bacterias patogénicas periodontales. Esto promueve aún más la disbiosis y aumenta la destrucción del tejido, generando así un ciclo patogénico autoperpetuante. Por lo tanto, las comunidades disbióticas asociadas con periodontitis son "inflamofílicas" (atraídas por la inflamación) en el sentido que parecen haber evolucionado no solo para soportar la inflamación, sino también para beneficiarse de ella y mejorar su capacidad de adaptación (figura 1).

Ciertas enfermedades sistémicas se han relacionado con las PDs. Concretamente, la gingivitis inducida por biofilm bacteriano (13) se ha asociado con enfermedades sistémicas de carácter inflamatorio (14–16), con alteraciones nutricionales (17) y con alteraciones hormonales como el embarazo (18,19).

Mientras que la gingivitis cursa con una inflamación aguda, la periodontitis instaura una inflamación crónica. La inflamación aguda se ocasiona por la presencia de biofilm en el surco gingival, adheridos a la superficie dental, e involucra principalmente a los neutrófilos, monocitos, macrófagos y, posteriormente, linfocitos T. Está mediada por aminas vasoactivas, eicosanoides, quimioquinas y citoquinas y se caracteriza por detectarse inmediatamente después del daño o alteración tisular, la presencia de agresiones físicas o químicas y por durar pocos días. El resultado de esta inflamación aguda puede ser la resolución, la formación de cicatrices o la inflamación crónica (20,21). La inflamación crónica se produce cuando falla la resolución de una inflamación aguda debido a patógenos no degradables, persistencia de cuerpos extraños, la incapacidad del sistema inmune para detener el daño generado por los patógenos o la autoinmunidad. En este caso, además de la participación de las células implicadas en la inflamación aguda, participan los linfocitos T y B, y fibroblastos. Los principales mediadores de la inflamación crónica serán eicosanoides, quimioquinas, citoquinas, factores de

crecimiento, especies reactivas de oxígeno (ROS [del inglés, Reactive Oxygen Species]) y enzimas hidrolíticas. El comienzo será retardado, de duración ilimitada y el resultado será la destrucción de tejidos, fibrosis y necrosis (20,21). Una vez se instaura la periodontitis, se produce una inflamación crónica de bajo grado no solo a nivel local, sino también a nivel sistémico que podría asociarse con un estado de estrés oxidativo y de disfunción mitocondrial.

Tradicionalmente, la diabetes mellitus tipo 1 (TD1 [del inglés, Type 1 Diabetes]) y tipo 2 (TD2) ha sido reconocida como factor de riesgo de periodontitis y se ha establecido una asociación bidireccional entre ambas enfermedades (4). Más recientemente, se ha propuesto que algunas complicaciones metabólicas tales como la dislipidemia y/o la resistencia a la insulina (IR [del inglés, Insulin Resistance]) podrían desempeñar un papel en la patogénesis de la periodontitis (22,23). En este sentido, patologías asociadas a la IR como el síndrome metabólico (24–26), la obesidad (27,28) y el síndrome de ovario poliquístico (PCOS [del inglés, Polycystic Ovary Syndrome]) (29–33) se han relacionado con la presencia de periodontitis. Además, en los últimos años se han establecido nuevas interacciones entre la periodontitis y otros trastornos sistémicos como la artritis reumatoide (34), enfermedades cardiovasculares (CV) (35), riesgo de partos prematuros e incluso algunos tipos de cáncer (36).

Concepto de salud periodontal

Anatomía periodontal

El periodonto es un tejido altamente vascularizado, recibe irrigación por parte de las arteriolas del septum interdental, ramas del ligamento periodontal, ramas alveolares y ramas dentarias.

En un periodonto sano, la encía libre tiene un color rosa y una forma festoneada dibujando la subyacente anatomía ósea. Dentro de las partes de la encía encontramos la encía libre y la encía insertada, que se encuentra adherida al diente en la línea amelocementaria por medio de numerosas fibras de colágeno. En la encía libre tenemos el margen gingival que delimita su límite superior, y surco gingival que delimita su límite inferior. El epitelio que se encuentra en el interior de la encía libre se denomina epitelio del surco, y en fondo del margen

gingival encontramos el epitelio de unión, delimitando el comienzo de la encía insertada (figura 2).

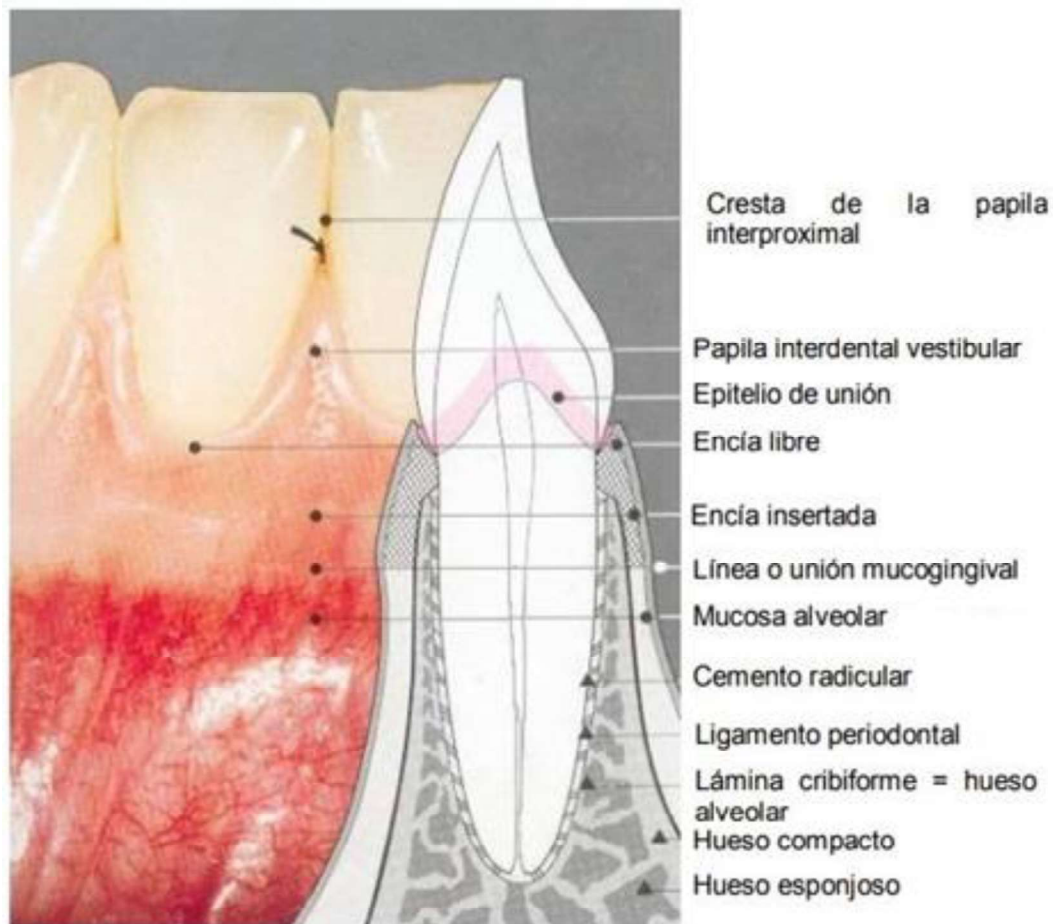


Figura 2. Anatomía del periodonto. Fuente: Facultad de Estomatología, Universidad Peruana Cayetano Heredia.

El tejido conectivo supracrestal está formado por fibroblastos (5%); células de los vasos sanguíneos, linfáticos, terminaciones nerviosas y matriz (35%) y fibras colágenas de tipo 1 (60%), que se organizan en haces: grupo gingivodental, periostiodental, circular, alveologingival y transeptal. El espacio que ocupa el surco gingival, epitelio de unión, y el tejido supracrestal, se denomina espacio biológico (37).

Criterios de salud periodontal

El concepto de salud periodontal debe incluir variaciones en la anatomía, dado que el periodonto sufre cambios fisiológicos a lo largo de la vida, se remodela constantemente por las fuerzas oclusales y se modifica ante ciertos tratamientos odontológicos como son las prótesis dentales, las restauraciones y por las consecuencias de las PDs.

Dentro del concepto de salud periodontal nos encontramos con tres situaciones clínicas: que el paciente presente el periodonto estable, intacto, que el paciente presente un periodonto reducido (paciente con periodontitis) tras el tratamiento periodontal o que presente como resultado del tratamiento periodontal una mejoría periodontal, pero con zonas en las que persiste la inflamación (38,39).

Estas situaciones de salud periodontal se han definido en el último World Workshop como:

Encía prístina: se refiere a un concepto histológico en que no se aprecian células inflamatorias en el tejido gingival.

Salud periodontal con periodonto intacto: sin alteraciones en ninguna de los parámetros periodontales, no hay retracción gingival, ni pérdida ósea, la encía presenta un color rosa coral, consistencia firme, festoneado de los márgenes gingivales, presencia de papilas interdentes conservadas y sin sangrado gingival (tras sondaje con sonda periodontal ni durante el cepillado dental) (39). Este estado es el que se define con mayor detalle en el consenso (en el grupo 1) y cuyos criterios clínicos detallaremos más adelante.

Control periodontal con periodonto reducido: en aquellos pacientes que han recibido tratamiento periodontal (paciente con algún tipo de periodontitis) pero que presenta tejido gingival sano.

Mejoría periodontal con el periodonto reducido: también ha recibido tratamiento periodontal, pero en localizaciones puntuales presenta pérdida de inserción clínica (CAL [del inglés, Clinical Attachment Level]).

Según el “Consensus Report of Workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions” (39) el periodonto intacto es el estado de la salud gingival clínica que contempla los siguientes criterios:

1. Ausencia de sangrado al sondaje (BOP [del inglés, Bleeding On Probing]): sondaje que debe de ser realizado con una sonda periodontal estandarizada de extremo romo, en 6 puntos de cada diente, 3 vestibulares (mesial, medial y distal) y 3 palatinos/linguales (mesial, medial y distal), con una fuerza que no supere los 0,2 N.
2. Ausencia de edema, eritema y síntomas referidos por el paciente, tales como sangrado durante el cepillado dental.
3. Ausencia de pérdida de CAL.
4. Pérdida ósea: los niveles fisiológicos se establecen entre 1,0-3,0 mm desde la unión amelocementaria.

Como hemos podido observar, la salud gingival clínica que no se refiere al periodonto intacto, sino que también contempla al periodonto de aquellos pacientes que han presentado periodontitis y que ha sido tratada con éxito. Para que se trate de un periodonto reducido debe de cumplir los mismos criterios que el estado de salud gingival clínica, pero presentando niveles de inserción clínica y óseos reducidos como consecuencia de la periodontitis. Para tener un criterio uniforme, con respecto al BOP, el paciente que presente un estado de salud gingival (ya sea periodonto intacto o reducido) debe de presentar un BOP < 10%, y una profundidad de sondaje (PPD [del inglés, Probing Pocket Depth]) ≤ 3 mm (tabla 1). Cuando el paciente ha tenido periodontitis y ha sido tratado, el estado de salud gingival, puede tardar varios meses en ser alcanzado. Dependiendo del control de los factores locales y sistémicos que influyen en las PDs, el paciente puede tener mayor o menor dificultad en restablecer su salud periodontal.

Definiremos como “estabilidad periodontal” al estado en el que el paciente consigue el control de los factores de riesgo, la ausencia de PPD de 4 mm o más que sangran al sondaje y la ausencia de destrucción periodontal progresiva (tabla 1). Este concepto tiene en cuenta la evolución del paciente tras el tratamiento periodontal y las sucesivas citas de mantenimiento periodontal en el cual será reevaluado periódicamente.

Gingivitis inducida por placa

La gingivitis inducida por la presencia de biofilm con placa bacteriana, se define como la inflamación local inducida por el acúmulo de placa bacteriana en el tejido gingival, pero que no invade la inserción periodontal. Es reversible, si se realiza una tartrectomía, y se dan instrucciones de higiene oral al paciente. La presencia de gingivitis es un factor de riesgo significativo de sufrir periodontitis (39). En cuanto al manejo de la gingivitis, tanto en un paciente con el periodonto intacto como en el que presente un periodonto reducido (tabla 1), es similar y consiste en retirar la placa bacteriana, tanto supragingival, como subgingival. Los síntomas que puede referir el paciente con gingivitis son: sangrado al cepillado dental, halitosis, dolor al comer, edema, inflamación y alteraciones estéticas.

El diagnóstico de la gingivitis se define por la presencia del sangrado al sondaje de al menos el 10% de los puntos de sondaje. Se deben sondar 6 puntos por cada diente, 3 vestibulares (distal, medial y mesial) y 3 palatinos/linguales (distal, medial y mesial). Se calcula como índice BOP. Número de puntos sangrantes/total de puntos sondados*100.

Además, se determinará la presencia de placa bacteriana. En ausencia de placa bacteriana se debe de realizar un diagnóstico diferencial para determinar si se trata de una gingivitis no inducida por placa.

Tabla 1. Criterios diagnósticos de salud gingival y gingivitis inducida por placa Adaptado de Chapple *et al.*, 2018 (39).

Parámetros	Conceptos					
	Periodonto intacto		Periodonto reducido (sin periodontitis)		Periodonto estable (periodontitis tratada con éxito)	
	Salud	Gingivitis	Salud	Gingivitis	Salud	Inflamación Gingival
CAL	NO	NO	SI	SI	SI	SI
PPD	≤3 mm	≤3 mm	≤3 mm	≤3 mm	≤ 4 mm	≤3 mm
BOP	<10%	Si >10%	<10%	Si >10%	<10%	Si >10%
Pérdida ósea radiográfica	NO	NO	Posible	Posible	SI	SI

BOP: sangrado al sondaje; CAL: pérdida de inserción clínica; PPD: profundidad de sondaje.

Dentro de las gingivitis inducidas por placa bacteriana, existen aquellas gingivitis que además de la presencia de placa bacteriana se asocian a factores de riesgo locales o sistémicos.

En cuanto a los factores sistémicos relacionados con la gingivitis en presencia de placa bacteriana, encontramos el tabaquismo (considerado sistémico por la hipoxia tisular generada por la nicotina), la hiperglucemia, los factores nutricionales, agentes farmacológicos, hormonas sexuales esteroideas, la pubertad, ciclo menstrual, embarazo, anticonceptivos orales (OC [del inglés, Oral Contraceptives]) y trastornos hematológicos.

Los factores locales predisponentes son, por un lado, aquellos factores retentivos de placa (restauraciones mal ajustadas, prótesis fijas que no permiten la correcta higiene oral, sobrecontorneada, mal ajustadas, pónicos no higienizables, faldones vestibulares amplios, etc.), la sequedad bucal (posiblemente derivada de un factor sistémico, ingesta de medicación xerostomizante, y/o ingesta insuficiente de agua) y el sobrecrecimiento gingival inducido por fármacos.

Gingivitis no asociadas a placa bacteriana y otras alteraciones gingivales

Desórdenes genéticos o del desarrollo: fibromatosis general hereditaria, que puede aparecer como una entidad aislada o asociada a otras alteraciones sistémicas formando parte de algún síndrome hereditario como el querubismo, el síndrome de Laband, el síndrome de Klippel-Trenaunay-Weber o el síndrome de Ehlers-Danlos.

Infecciones específicas: de tipo bacteriano, vírico (virus de inmunodeficiencia humana, herpes virus, entre otros) o fúngico (40,41).

Lesiones y condiciones inflamatorias e inmunes: reacción de hipersensibilidad a materiales dentales, como puede ser la reacción liquenoide, enfermedades autoinmunes de la piel y mucosas (lupus eritematoso, liquen plano, psoriasis, pénfigo y penfigoide).

Procesos reactivos: épulis, granuloma piogénico, granuloma fibroblástico calcificante, granuloma periférico de células gigantes y gingivitis del embarazo.

Neoplasias: leucemias, linfomas, carcinoma oral de células escamosas y lesiones con zonas de eritroplasias sangrantes cercanas al tejido gingival.

Discrasias sanguíneas no oncológicas: neutropenia congénita severa y el síndrome mielodisplásico.

Enfermedades endocrinas, metabólicas y nutricionales: malnutrición y déficit de vitamina C.

Lesiones traumáticas: agresiones físicas (queratosis friccional en zonas edéntulas, cepillado agresivo que genera inflamación y abrasiones, tratamientos dentales que usan clamps, rollitos de algodón, traumatismo por accidentes que generan laceraciones, etc.), agresiones químicas (reacción de clorhexidina, aspirinas colocadas en contacto con la mucosa, lesiones por anestesia dental, entre otras) y agresiones térmicas (quemaduras de la mucosa y de la encía por alimentos calientes).

Periodontitis

La periodontitis se define como una enfermedad de carácter inflamatorio, causado por la respuesta del huésped susceptible ante la agresión de bacterias periodontopatógenas. Es de origen multifactorial e intervienen factores genéticos y epigenéticos que condicionan la respuesta del huésped ante la agresión bacteriana y también factores de riesgo ambientales y adquiridos (de comportamiento) como la higiene oral, el tabaco, o patologías sistémicas que puedan influir en la susceptibilidad del paciente, entre otros.

Tipos de periodontitis, clasificación

La clasificación de periodontitis ha ido cambiando a lo largo de los años. El criterio de clasificación del año 1990 definido por Armitage (42) comprendía siete tipos de periodontitis:

- Periodontitis crónica
- Periodontitis agresiva
- Periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica
- Enfermedades periodontales necrosantes
- Abscesos del periodonto
- Periodontitis asociadas a lesiones endodónticas

- Deformidades y trastornos del desarrollo o adquiridas

Esta clasificación diferenciaba la periodontitis crónica y la agresiva principalmente por la edad del paciente y el tiempo de evolución. Aquellos pacientes mayores de 35 años de edad, con periodontitis de largo tiempo de evolución, con una pérdida de hueso con tendencia al patrón horizontal, se definían como periodontitis crónica.

En el caso de que la edad del paciente fuera menor a 35 años, con una periodontitis de evolución rápida, un patrón de pérdida de hueso vertical, con bolsas profundas, y buen control de la placa bacteriana, se diagnosticaba el caso como una periodontitis agresiva.

Esta diferenciación por tiempo de evolución y edad del paciente, se ha modificado en la actual clasificación al basarse en su fisiopatología (43).

La fisiopatología es fundamental para entender los factores que han influido en el desarrollo y evolución de la periodontitis. De esta forma, el abordaje tendrá en cuenta al paciente en su conjunto (estado de salud general, factores de riesgo locales y sistémicos y grado de afectación periodontal clínica y radiográfica).

Además, el criterio de diagnóstico más empleado hasta ahora, era utilizar la presencia/ausencia de bolsas periodontales para definir un caso de periodontitis. A día de hoy se evalúa la PPD, CAL y la pérdida ósea radiográfica para diagnosticar un caso de periodontitis.

Un paciente con periodontitis debe presentar: reducción de CAL interdental en dos o más dientes no adyacentes, o bien menor CAL vestibular ≥ 3 mm con bolsas de > 3 mm en dos o más dientes. Se enumeraron una serie de excepciones, para evitar situaciones en las que la pérdida de inserción no estaba asociada a periodontitis, entre las que se incluyen: recesión gingival por razones traumáticas, caries en la región cervical, menor CAL en la cara distal de un segundo molar (posiblemente asociada a una malposición o extracción del tercer molar), lesión endodóntica o fractura radicular vertical (43).

La nueva clasificación de periodontitis que se llevó a cabo en el “Consensus Report of Workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions” (43) identifica tres formas de periodontitis basándose en su fisiopatología:

1. Periodontitis necrosante

2. Periodontitis como manifestación directa de enfermedades sistémicas (tabla 2)
3. Periodontitis que debe ser caracterizada por el estadio y los grados de afectación empleando métodos de diagnósticos clínicos y radiográficos (tablas 3 y 4)

1. Periodontitis necrosante

La periodontitis necrosante se caracteriza por ser una afectación periodontal en un paciente que presenta un estado inmunológico deprimido. Las bacterias causantes de esta infección son bacterias oportunistas. Se han señalado una gran cantidad de factores, entre ellos la infección de una pléyade de bacilos fusiformes y espiroquetas. La mayoría de los autores están de acuerdo que esta enfermedad está causada por la asociación fuso-espirilar, formada por un bacilo, el *Bacillus fusiformis*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Selenomonas* y una espiroqueta, la *Borrelia* o *Spirochetta vincentii* que coexisten en simbiosis. Se ha relacionado la periodontitis necrotizante con factores de riesgo como el estrés, el cansancio, un incorrecto estado nutricional (deficiencias de vitaminas, sobre todo las del grupo C), el tabaco, la mala higiene oral, inmunodeficiencias (comúnmente causadas por infecciones víricas) o inmunosupresión por fármacos. También ciertos tipos de alteraciones hematológicas pueden predisponer a padecer este tipo de periodontitis como son la neutropenia, la anemia aplásica y la agranulocitosis. (44)

Este tipo de periodontitis se caracteriza por presentar papilas gingivales ulceradas, sobre todo en los incisivos y caninos, dolor intenso, halitosis y molestias que suelen impedir la correcta alimentación del paciente, siendo este uno de los principales motivos de consulta del paciente. Además, se produce sangrado y presencia de tejido necrótico, de aspecto blanquecino en los bordes gingivales.

Recientemente, durante la pandemia del COVID-19 (del inglés, Coronavirus Disease), se han reportado casos de pacientes infectados por COVID-19, que han presentado gingivitis y periodontitis necrotizantes. En este caso, la predisposición se puede presentar a través de una doble vía, por un lado, el estado inmunológico inmunodeprimido por la propia afectación viral y, por la otra, el efecto sumatorio de los factores locales. Entre los factores locales de los

pacientes infectados por COVID-19 (teniendo en cuenta que se trate de un paciente que presente manifestaciones clínicas de la infección), la falta de una correcta higiene oral en los pacientes encamados de larga estancia, la sequedad bucal y la imposibilidad del cepillado dental en aquellos pacientes que reciben intubación endotraqueal podrían contribuir al aumento de la incidencia de estas patologías (45).

2. Periodontitis como manifestación de una enfermedad sistémica

La periodontitis puede presentarse en pacientes que padezcan una enfermedad sistémica de tipo inflamatorio, patologías que afecten al sistema inmunológico, como aquellas alteraciones que afecten al número o funcionamiento de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs [del inglés, Polymorphonuclear leukocytes]), patologías que afecten a la integridad del tejido conectivo y al hueso, alteraciones de tipo hematológico, genético y otras patologías asociadas. En el último consenso, llevado a cabo por el grupo 3 de expertos en periodoncia (46), se planteó dividir las enfermedades sistémicas en tres grandes grupos (tabla 2):

2.1. Alteraciones sistémicas que tienen un impacto importante en la pérdida de tejidos periodontales al influir en la inflamación periodontal (tabla 2.1).

2.2. Alteraciones sistémicas que pueden influir en el mecanismo patogénico de la enfermedad periodontal (tabla 2.2)

2.3. Alteraciones sistémicas que pueden generar una pérdida de tejidos periodontales, independientemente de la periodontitis (tabla 2.3)

Tabla 2. Periodontitis como manifestación de enfermedades sistémicas según el “Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Condition” (46).

2.1 Alteraciones sistémicas que tienen un impacto importante en la pérdida de tejidos periodontales al influir en la inflamación periodontal

Alteraciones genéticas

Enfermedades asociadas con trastornos inmunológicos

- Síndrome de Down
- Síndromes que afectan a la adhesión de leucocitos
- Síndrome de Papillon-Lefèvre
- Síndrome de Haim-Munk
- Síndrome de Chediak-Higashi
- Neutropenia severa y neutropenia congénita (Síndrome de Kostman)
- Neutropenia cíclica
- Inmunodeficiencias primarias y granulomatosis crónica
- Síndromes de hiperinmunoglobulina E
- Síndrome de Cohen

Enfermedades que afectan a la mucosa oral y al tejido gingival

- Epidermólisis bullosa
- Síndrome de Kindler
- Deficiencia de plasminógeno

Enfermedades que afectan al tejido conectivo

- Síndrome de Ehlers-Danlos (tipos IV, VIII)
- Angioedema (deficiencia del inhibidor C1)
- Lupus eritematoso sistémico

Alteraciones metabólicas y endocrinas:

- Enfermedad por almacenamiento de glucógeno- Enfermedad de Gaucher
- Raquitismo hipofosfatémico e hipofosfatasa leves en adultos.
- Síndrome de Hajdu-Cheney

Inmunodeficiencias adquiridas

- Neutropenia adquirida
- Infección de VIH-SIDA

Enfermedades inflamatorias

- Epidermólisis ampollar adquirida
- Enfermedad inflamatoria intestinal

2.2 Alteraciones sistémicas que pueden influir en el mecanismo patogénico de la enfermedad periodontal

- Diabetes (tipo 1y2)
- Obesidad
- Osteoporosis
- Artritis reumatoide
- Estrés emocional y depresión
- Fumar (dependencia a la nicotina)
- Medicamentos

2.3 Alteraciones sistémicas que pueden generar una pérdida de tejidos periodontales, independientemente de la periodontitis

Neoplasias

Neoplasma primario en tejido periodontal

- Carcinoma oral de células escamosas
- Tumor odontogénico
- Otros neoplasmas primarios en tejido periodontal

Metástasis secundarias de localización en tejido periodontal

Otros trastornos que pueden afectar al tejido periodontal

- Granulomatosis con poliangeítis (Wegener)
- Histiocitosis de células de Langerhan
- Granulomas de células gigantes K10.1 Hiperparatiroidismo
- Esclerosis sistémica (esclerodermia)
- Enfermedad de los huesos evanescentes (síndrome de Gorham-Stout)

-
3. Periodontitis que debe ser caracterizada por el estadio y grado de afectación. Se determina el estadio (del I al III) según el aumento de CAL, PDD, la pérdida ósea radiográfica y el número de ausencias dentales por causa periodontal. Se tiene en cuenta la edad del paciente, los factores locales y sistémicos y el tiempo de evolución para establecer la gravedad, complejidad, extensión y el grado (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Estadios de periodontitis que determinan la severidad de la periodontitis y la complejidad en el manejo de la enfermedad.

		Estadio I	Estadio II	Estadio III	Estadio IV
Gravedad	CAL	1-2 mm	3-4 mm	≥5mm	≥8mm
	Pérdida ósea radiográfica	1/3 coronal (<15%)	1/3 coronal (15-33%)	Extensión 1/3 medio	Extensión a 1/3 apical
	Pérdida dentaria	Sin pérdida de dientes por causa periodontal		≤ 4 dientes perdidos por causa periodontal	≥5 dientes perdidos por causa periodontal
Complejidad	PPD	Máxima ≤4mm	Máxima ≤5mm	6-7 mm	≥8mm
	Patrón de pérdida ósea	Principalmente horizontal		Al estadio II <u>se añaden:</u> *Pérdida ósea vertical ≥3mm *Furca grado II o III *21-28 dientes residuales	Al estadio II <u>se añaden:</u> *Disfunción masticatoria, movilidad dental ≥2, trauma oclusal secundario *Colapso de mordida, migraciones, abanicamiento *<20 dientes residuales
Extensión y distribución	Añadir a estadio como descriptor	En cada estadio, describir como extensión localizada si afecta a <30% de los dientes, generalizada si afecta a >30% de dientes, o patrón malar/incisivo.			

CAL: pérdida de inserción clínica; PPD: profundidad de sondaje.

Tabla 4. Grados de periodontitis, según características biológicas, ratio de progresión y evaluación del riesgo.

		Grado A	Grado B	Grado C
Evidencia directa	RX o evaluación periodontal (últimos 5 años)	No evidencia de pérdida de hueso/ inserción	Pérdida de <2mm	Pérdida de >2mm
Evidencia indirecta	Pérdida ósea/edad	<0.25	0.25-1.0	>1.0
	Fenotipo	Grandes depósitos de biofilm con niveles bajos de destrucción	Destrucción proporcional a los depósitos de biofilm	Grado de destrucción desproporcional teniendo aparición temprana, progresión rápida, y/o falta de respuesta a los TTOperio.
Factores modificadores	Tabaquismo	No fumador	<10 cig. al día	>10 cig. al día
	Diabetes	Glucemia estable / no diabetes	Hemoglobina glicosilada <7 con diabetes	Hemoglobina glicosilada >7 con diabetes

Cig: cigarrillos; RX: radiografías previas de tipo ortopantomografía y/o serie periapicales; TTOperio: tratamientos periodontales.

Teniendo en cuenta el estadio (I-IV), el grado (A, B, o C) y la extensión (localizada, generalizada, o patrón incisivo/molar) se debe de diagnosticar cada caso de periodontitis asignando un valor a cada una de las tres determinaciones. La clasificación de las enfermedades periimplantarias, se recogen en el “Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Condition” (46). Los tejidos periimplantarios presentan un surco periimplantar, epitelio de unión, tejido conectivo y hueso circunferencial, pero no contemplan la presencia del ligamento periodontal ni del cemento radicular. Por este motivo, al tratarse de un grupo de enfermedades que no afectan al periodonto como tal, dado que este tejido, se localiza exclusivamente alrededor de los dientes y desaparece tras la exodoncia dental, este grupo de enfermedades no ha sido incluido en esta revisión.

Patogénesis de la enfermedad periodontal

Las PDs por ser enfermedades de etiología multifactorial, se desarrollan en el paciente al presentarse una serie de factores de riesgo, y la presencia de placa bacteriana dental, que es necesaria, pero no suficiente para que se desarrolle la enfermedad. Cuando dicha placa permanece en el diente durante un tiempo, se activará la respuesta inmunitaria del huésped. Si la respuesta de huésped es efectiva, los mecanismos de respuesta inmune innata y adaptativa (mediada por los leucocitos PMNs y la generación de anticuerpos, respectivamente) podrán contener los mecanismos de destrucción de las bacterias periodontopatógenas. Si, por el contrario, se produce una respuesta exacerbada de los mecanismos inflamatorios del sistema inmunitario, los antígenos de las bacterias y los lipopolisacáridos presentes en el tejido periodontal, fomentarán la secreción de citoquinas proinflamatorias, metaloproteinasas y prostaglandinas, que comenzarán a destruir el tejido conectivo. También se producirá una destrucción y reabsorción del hueso alveolar. Clínicamente, se observará la presencia de sangrado al sondaje, recesiones gingivales, presencia de troneras, y radiográficamente se apreciará pérdida de hueso. Durante el proceso, intervienen factores de riesgo ambientales, de comportamiento, genéticos y epigenéticos (figura 3).

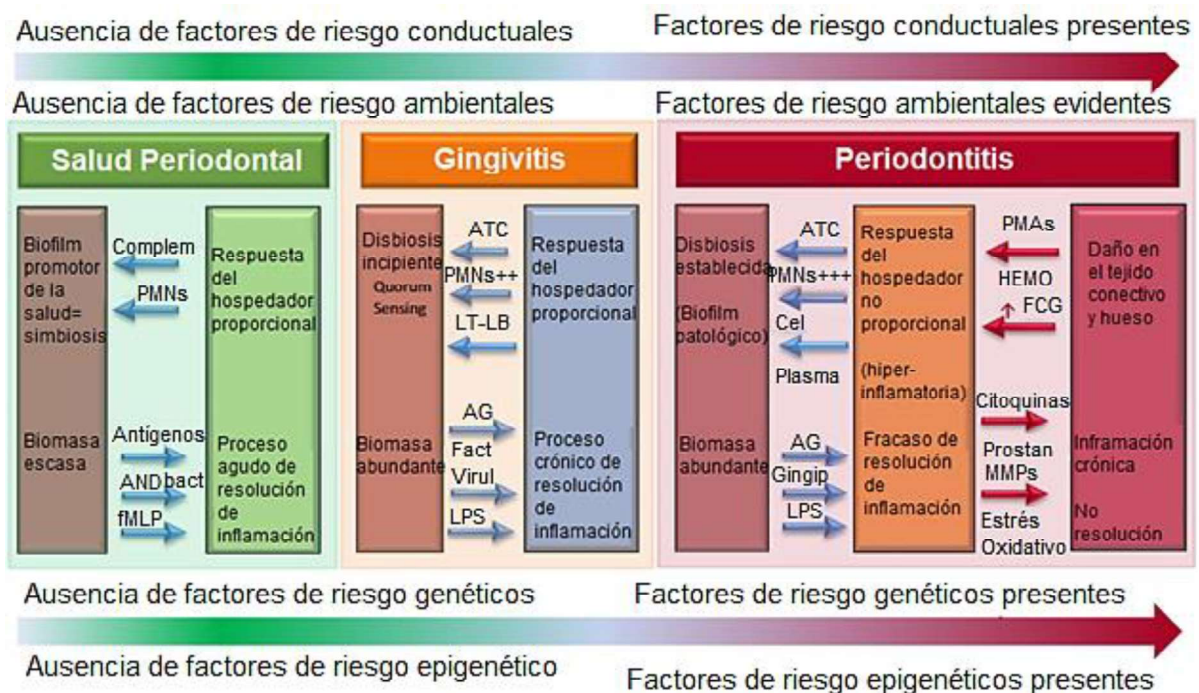


Figura 3. Modelo contemporáneo de interacciones huésped-microbiota oral en la patogénesis de las PDs. La respuesta del huésped provoca una disbiosis incipiente

(gingivitis), si el biofilm no se rompe/elimina, se produce una disbiosis y se perpetúa una inflamación destructiva y crónica que no se resuelve. ATC: anticuerpos; AG: antígenos; Cel Plasma: células plasmáticas; ADN bact: ADN bacteriano; complement: complemento; FCG: fluido crevicular gingival; Fact Virul: factores de virulencia; fMLP: N-formilmetionil-leucil-fenilalanina; gingip: gingipainas (proteasas secretadas por *Porphyromonas gingivalis*); HEMO: proteínas del grupo hemo; LB: linfocitos B; LT: linfocitos T; LPS: lipopolisacárido; MMPs: metaloproteinasas de matriz; PMAs: patrones moleculares asociados a daño; PMNs: leucocitos polimorfonucleares; prostan: prostanoideos (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos). Fuente: adaptado de Meyle *et al.*, 2015 (47).

Factores de riesgo conductuales y ambientales:

Dentro de los conductuales destacamos los hábitos de higiene oral, el tabaquismo, el alcoholismo y el estrés (48). Dentro de los ambientales encontramos la maloclusión dental, que conlleva presencia de apiñamientos y malposición con tendencia a la protrusión dental es también un factor de riesgo para que se inicie la periodontitis, sobre todo por la dificultad de higiene dental que se presenta en estos casos. También otro factor es la respiración oral y la incompetencia del sellado labial por modificar la hidratación de los tejidos periodontales, fomentando la sequedad bucal y reduciendo el papel de la saliva como factor protector. La presencia de restauraciones y prótesis dental que no permitan una higiene correcta, es otro de los factores que pueden influir, por ser sitios que generan retención de placa bacteriana, al igual que ocurre con los retenedores fijos de ortodoncia.

Factores de riesgo adquiridos:

La presencia de enfermedades adquiridas que afecten al sistema inmunológico pueden aumentar la susceptibilidad del paciente, ante la agresión de las bacterias periodontopatógenas. La diabetes (49–51), la obesidad (28,52,53), las enfermedades que presenten resistencia a la insulina (28,29,32,54,55) y las enfermedades de tipo inflamatorio crónico de bajo grado como puede ser la artritis reumatoide (34), entre otras patologías. También las patologías infecciosas, como el virus de inmunodeficiencia humana (56), y la condición adquirida de inmunodepresión por tratamiento con fármacos de tipo

quimioterapia y/o radioterapia, aumentan la susceptibilidad del paciente ante las agresiones bacterianas.

Factores de riesgo genéticos: el polimorfismo en los genes reguladores de ciertas citoquinas que participan en la patogénesis de las PDs, ha sido motivo de numerosas investigaciones (57–65), revisiones sistemáticas y metaanálisis (66–70). El primer gen en el que se descubrió un polimorfismo fue en la interleuquina (IL) 1 alfa (IL1 α) e IL1 β , posteriormente de la IL6 e IL10 en las anteriormente denominadas periodontitis crónicas y el polimorfismo en el receptor de la vitamina D (60,61,63,64,66,68,70). También se ha estudiado el polimorfismo en glóbulos blancos, concretamente en el receptor Fc γ R y su relación con las periodontitis de comportamiento agresivo, aunque con resultados poco concluyentes (64,65,69). A través de técnicas de rastreo genómico, se han asociado ciertos genes con la periodontitis como son: el ANRIL (un tipo de RNA no codificante) (71,72) (factor de riesgo para enfermedades CV y periodontitis), ciclooxigenasa (COX) 2 (73,74), el péptido antimicrobiano defensina beta 1 (DEFB1 [del inglés, Defensin Beta 1]) (75–77) y genes glucotransferasa 6 que contienen el dominio 1 (GLT6D1 [del inglés, genes glycosyltransferase 6 domain containing 1]) (72) entre otros.

Factores de riesgo epigenéticos: en este caso se han estudiado factores que regulan la expresión de ciertos genes, sin que haya modificaciones en la secuencia de la cadena de ácido desoxirribonucleico (DNA [del inglés, Deoxyribonucleic Acid]). Uno de los factores más estudiados son los microRNA, una clase de RNA (RNA [del inglés, Ribonucleic Acid]) no codificante de pequeño tamaño (entre 17-24 nucleótidos) y su papel en el desarrollo de las PDs. La función principal del microRNA es regular negativamente a nivel postranscripcional la expresión de genes que codifican proteínas, mediante su hibridación con secuencias complementarias localizadas en las regiones 3' no traducidas de RNA mensajeros (RNAm), e inhibir su traducción o disminuir su vida media. De esta forma, las investigaciones han analizado el perfil de expresión (en suero, plasma y tejido periodontal) de ciertos microRNAs, pudiendo estar regulado a la baja o a la alta en pacientes con PDs (47,78). La sobreexpresión de microRNAs como el Let-7i y el miR-146a se han relacionado

con la regulación del receptor tipo toll 4 (TRL4) en pacientes con periodontitis (79) Este receptor está presente en la superficie celular de los monocitos/macrófagos, células dendríticas, mastocitos y linfocitos B y se encarga de la detección de bacterias Gram negativas en la inmunidad innata. La expresión a la baja del miR-155 y el miR-200c se ha encontrado en pacientes con PDs que actúan sobre TRL1,2 y 4 (61,78,79). La quimiotaxis de los leucocitos regulada por las quimioquinas CXCL12/CXCR4 se ha relacionado con una regulación a la baja del miR-141 en pacientes con periodontitis comparado con controles sanos (61,78,79). Al igual que la regulación de la angiogénesis por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF [del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor]) que se ha relacionado con la expresión a la baja del miR203 en pacientes con PDs.

Además de las vías de investigación sobre los microRNAs, existen vías que se centran en la administración ácidos grasos en la dieta, para modular la expresión de las lipoxinas (mediadores lipídicos antiinflamatorios). La metabolización de omega 3 adquirido de los alimentos, consigue un aumento de las resolvinas (que realizan una función similar a las lipoxinas). Se ha investigado la acción de las resolvinas (sobre todo la resolvina E1) en el proceso de resolución de la inflamación aguda presente en pacientes con periodontitis activas (80). La ingesta de alimentos ricos en omega 3 podría tener un potencial antimicrobiano sobre la bacteria *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, uno de los patógenos periodontales más estudiados por su implicación en las periodontitis (80,81). Dentro de las acciones antiinflamatorias de la resolvina E1 encontramos el bloqueo de la migración de los neutrófilos al endotelio. La administración de suplementos nutricionales con omega 3 y la generación de resolvina E1 como parte del tratamiento periodontal, está actualmente en investigación (80,82–84). Este modelo de etiopatogénesis actual descrito por Meyle *et al.*, 2015 (47) (figura 3) procede del modelo de descrito por Page y Kornman 1997 (85), pero en este caso, contempla el concepto de disbiosis-simbiosis bacteriana y demás aspectos moleculares contemporáneos como la influencia de los microRNAs en la epigenética, el consumo de omega 3 en la dieta, el estrés oxidativo y los cambios endoteliales producidos por la inflamación.

Respuesta inmune - inflamación y estrés oxidativo -

Cuando el proceso de inflamación aguda no se resuelve, sino que se mantiene, se vuelve un proceso de inflamación crónica donde ocurren cambios a nivel histológico que se ven reflejados clínicamente.

Para entender el proceso que ocurre en la inflamación causada por las PDs, es necesario recordar que el sistema inmunológico presenta varios tipos de sistemas de respuesta. Por un lado, diferenciamos la inmunidad innata, y la inmunidad adquirida. Dentro de la inmunidad innata podemos distinguir las barreras mecánicas, físicas, químicas y biológicas (otros microorganismos competidores), que son una primera línea de defensa. Si estas barreras no han sido suficientes para detener al microorganismo potencialmente patógeno, comenzarán a actuar contra el patógeno células como los neutrófilos, monocitos, macrófagos y células natural killers.

La segunda línea de defensa será la inmunidad adquirida, humoral (mediada por anticuerpos) y la celular (mediada por linfocitos).

A nivel del periodonto, la inmunidad innata comienza desde la lámina basal del epitelio del surco gingival y el epitelio de unión. Dentro del surco, existe una constante acumulación de microorganismos, pero en condiciones de salud periodontal, muestran un equilibrio (cualitativo y cuantitativo) entre las diferentes especies bacterianas, sin causar patología. El fluido crevicular gingival (GCF [del inglés, Gingival Crevicular Fluid]) está dentro del surco, elimina bacterias mecánicamente y contiene lisozimas, inmunoglobulinas (IgG, IgA) y neutrófilos PMNs. El GCF se origina a partir del líquido intersticial y de los vasos sanguíneos, denominado extravasación plasmática y aumenta cuando existe inflamación. Las células que conforman el epitelio del surco y el epitelio de unión están en constante recambio, de forma que ese proceso de renovación epitelial, ayuda a que se desprendan los microorganismos adheridos al epitelio. Los macrófagos, las células dendríticas y los neutrófilos fagocitan bacterias del surco gingival y de tejidos adyacentes. En este proceso, el sistema del complemento (formado por aproximadamente unas 60 proteínas) ayuda en la fagocitosis de las bacterias, estimula la quimiotaxis de los leucocitos y monocitos al epitelio de unión y participa en la lisis bacteriana. Otro de los mecanismos que actúan en la

inmunidad innata son las citoquinas como la IL1, IL8 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α [del inglés, Tumour Necrosis Factor alpha]) y las defensinas que se producen desde el epitelio de unión y poseen actividad antimicrobiana de amplio espectro.

La proteína quimiotrayente de monocitos 1 (MCP1 [del inglés, Monocyte Chemoattractant Protein 1]) está implicada en el reclutamiento o migración de leucocitos y más concretamente de monocitos, a los focos de donde está teniendo lugar la respuesta inflamatoria, en este caso el periodonto. Esta proteína se ha detectado tanto en suero como en saliva y su aumento se relaciona con la exacerbación de la gravedad de la periodontitis, así como su progresión (86,87). Las MMPs presentes en el ligamento periodontal (secretadas por patógenos periodontales como el *Treponema dentícula* y la *Porfiromona gingivalis*) también generan un aumento de la migración de los monocitos. En consecuencia, se induce la apoptosis o supresión de la diferenciación osteoblástica, estableciendo un fenotipo destructivo. En los PMNs estimulados, la enzima MPO (enzima oxidoreductasa almacenada en los gránulos azurófilos de neutrófilos PMNs) cataliza la producción de ácidos hipohalogenosos, principalmente ácido hipocloroso, y otros intermedios tóxicos que aumentan poderosamente la actividad microbicida (pero al mismo tiempo genera un mayor número de componentes pro-oxidantes). Esta MPO que se libera durante la degranulación de los neutrófilos, es proporcional al número de neutrófilos infiltrados en el tejido, por lo que se puede utilizar su actividad como índice de migración leucocitaria y, por lo tanto, de estrés oxidativo. Por ello, la cuantificación de la MPO, de MMPs y MCP1 es empleada en estudios de investigación para determinar perfiles inflamatorios relacionados con la patogénesis de las PDs (29,86–93).

Cuando el equilibrio entre las bacterias periodontopatógenas y el hospedador se pierde, fracasa la inmunidad innata, y no es posible detener los mecanismos inflamatorios defensivos que se han desencadenado por la agresión bacteriana, se perpetúa la respuesta inflamatoria, y se activa la inmunidad adaptativa. En consecuencia, el epitelio de unión migra, insertándose más apical de la línea amelocementaria, evidenciándose la pérdida ósea marginal.

La activación de la inmunidad adaptativa, se evidencia por la presencia de un alto número de linfocitos T CD4 (sobre todo del perfil Th1 [del inglés, helper], Th2, Th 17, Treg [del inglés, T regulatory]) y linfocitos B en el tejido conectivo, con la intención de ayudar a resolver el proceso inflamatorio.

Un cambio a una microbiota más patogénica, Gram negativa, anaeróbica y dominada por microorganismos como *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*, puede marcar el inicio de la pérdida de inserción y formación de bolsas periodontales. A medida que se vuelve más compleja la microbiota, el sistema inmune sigue siendo estimulado y esta vez, la acumulación de células inflamatorias, citoquinas y MMPs se distribuyen cada vez más en sentido apical dentro del tejido conectivo. Esta lesión periodontal, producida por esta respuesta exacerbada del sistema inmune, presenta como características inmunológicas una respuesta inmune innata disminuida, abundantes plasmocitos (50%) y linfocitos T CD4. Los linfocitos del perfil Th2 producen IL4, IL5, IL6 e IL10, favoreciendo la producción de IgG4, IgE y supresión de macrófagos. Continúa siendo intrigante, la razón por la cual una lesión periodontal presenta altos números de plasmocitos y aun así no se consigue controlar el efecto de las bacterias periodontopatógenas y se generan las PDs. La respuesta puede estar en la forma en la que los microorganismos periodontopatógenos modulan la expresión de la respuesta inmune, pudiendo deberse a la producción de anticuerpos de baja afinidad y la activación policlonal de linfocitos B (94). Este hecho, podría deberse a la incapacidad para generar memoria inmunológica, la producción de proteasas que degradan los anticuerpos y que los determinantes antigénicos no inducen maduración y cambio de isotipo de los anticuerpos (94).

Adicionalmente, la interacción célula-célula de linfocitos B con linfocitos T CD4, es fundamental para producir anticuerpos de gran especificidad. Por tanto, la polarización hacia una respuesta Th1 o Th2 puede ser determinante para el desarrollo de una lesión periodontal avanzada. De esta forma, un paciente con periodontitis puede tener grandes cantidades de linfocitos B productores de anticuerpos, solo que estos no brindan protección ni neutralización del agente infeccioso. Por otra parte, los linfocitos T CD4 expresan y producen RANKL31,

una citoquina determinante en la activación de osteoclastos junto con $IL1\beta$ y $TNF\alpha$. Pero los monocitos y macrófagos no solo producen citoquinas, también producen MMP2, MMP3 y MMP9, mientras que los fibroblastos gingivales producen principalmente MMP1. Estas enzimas producidas dentro del tejido conectivo por las células inflamatorias, permiten la degradación de las fibras colágenas y, en consecuencia, la inserción de tejido conectivo. Paralelamente, la zona cercana a la cresta ósea, se produce $IL1\beta$, $TNF\alpha$ y RANKL.

Esta cascada de mediadores moleculares favorece la activación de osteoclastos y permite la pérdida ósea (figura 4). Al quedar sin soporte periodontal, el epitelio de unión migra de forma patológica en sentido apical, presentándose clínicamente como la bolsa periodontal.

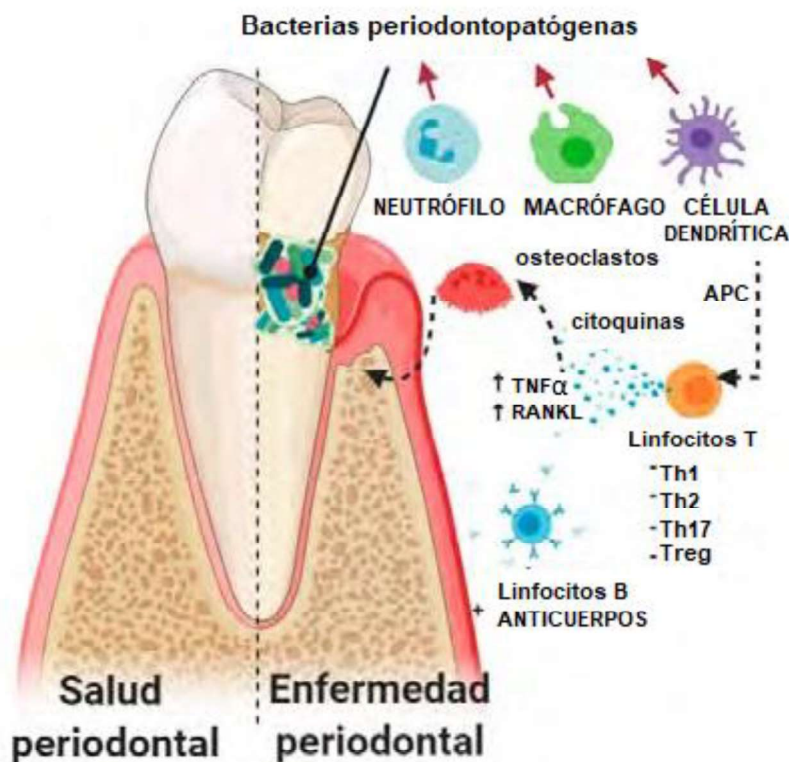


Figura 4. Papel del sistema inmune en la patogénesis de las PDs y su consecuente proceso de inflamación crónica. Las células de la inmunidad innata son atraídas al sitio de lesión para destruir los microorganismos patógenos. Las células dendríticas presentan el antígeno a los linfocitos T y B, activando la inmunidad adaptativa. En el proceso hay un aumento de citoquinas como el $TNF\alpha$ y RANKL que inducen la activación de osteoclastos generando la reabsorción del hueso de soporte periodontal. APC: células presentadoras de antígenos, RANKL: ligando de receptor activador para

el factor nuclear κ B; Th1, Th2 y Th17: linfocitos T helper; Treg: linfocitos T reguladores; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. Fuente: Becerra *et al.*, (95) 2021.

El inflamasoma NLRP3: Un sensor de la inmunidad innata

Los inflamosomas son complejos proteicos localizados en el citoplasma de las células, que actúan como sensores y son mediadores del desarrollo de la inflamación. Se encuentra principalmente en macrófagos, monocitos, células dendríticas y neutrófilos. El inflamasoma dominio de pirina NLR que contiene 3 (NLRP3 ([del inglés NOD, LRR and Pyrin domain-containing Protein 3]) es un complejo proteico asociado a la apoptosis que contiene un dominio de activación y reclutamiento de caspasa (SC) y caspasa-1 (conocida como la encima convertidora de IL1), y es importante para la maduración de IL1 β e IL18. El NLRP3 activa la procaspasa 1, transformándola en caspasa 1, necesaria para la maduración de la de pro-IL1 y pro-IL18 para conseguir las correspondientes ILs. El NLRP3 está implicado no solo en trastornos inflamatorios, sino también en numerosas enfermedades metabólicas, siendo por ello uno de los inflamosomas más estudiados hasta la fecha.

El inflamasoma NLRP3 puede ser activado por varios patrones moleculares asociados con el peligro del huésped. Normalmente, el reconocimiento del lipopolisacárido (LPS) -un patrón molecular asociado a patógenos (PAMPs) -, por parte del receptor TLR4 actúa como señal de cebamiento para las células del sistema inmune innato. A través del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF κ B [del inglés, Nuclear Factor kappa B]) se induce la transcripción y producción de pro-IL1, pro-IL18 y NLRP3 ubiquitinado. Las segundas señales necesarias para ensamblaje y activación del complejo del inflamasoma son notablemente diversas e incluyen el flujo de K⁺, la señalización de Ca²⁺ y el daño mitocondrial y lisosomal en forma ROS mitocondriales, DNA mitocondrial oxidado y proteasas lisosomales (96). En estas condiciones, NLRP3 se desubiquitina y se asocia con ASC y procaspasa-1 formando un gran complejo proteico multimérico (97). La caspasa-1 activada mediante autoproteólisis (19) escinde después la pro-IL-1 β y la pro-IL-18 a sus formas maduras, que son secretadas actuando como citoquinas proinflamatorias (98).

Un estudio reciente describió que el inflamasoma NLRP3 desempeña un papel importante en la resorción ósea, el remodelado óseo y en las enfermedades inflamatorias que afectan al tejido óseo como la periodontitis, la osteoporosis y la artritis reumatoide (99). Se ha propuesto que el NFκB es el sensor del estrés oxidativo que puede ser activado por ROS y por las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK [del inglés, Mitogen-Activated Protein Kinase]). Las MAPK pueden controlar varias actividades celulares, incluida la expresión génica, la mitosis, la diferenciación y la supervivencia celular y la apoptosis. Dentro de las MAPK, las proteínas ERK, p38 y JNK (del inglés, c-Jun N-terminal kinase) tienen funciones importantes en la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunitarias y en la activación del inflamasoma NLRP3.

En pacientes con periodontitis, la IL1β es un marcador potencial de la enfermedad, debido a su elevada concentración en el GCF (100) y en la saliva (101). De hecho, numerosos estudios experimentales (en humanos, modelos murinos de periodontitis crónica o modelos in vitro inducidos principalmente por *Porphyromonas gingivalis*) demostraron que el inflamasoma NLRP3 está implicado en el desarrollo de la inflamación gingival y la posterior pérdida ósea, debido a una respuesta inmunitaria exacerbada del periodonto (101,102). Además, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* también ha mostrado mediar la activación del NLRP3 en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs [del inglés, Peripheral blood mononuclear cells]) (103).

ROS, activación de NFκB y quinasas JNK

En condiciones fisiológicas normales, se mantiene un equilibrio dinámico entre las ROS y las defensas antioxidantes. El estrés oxidativo se produce cuando este equilibrio se desplaza a favor de las ROS y se cree que desempeña un papel causal en la patogenia de muchas enfermedades sistémicas, incluidas la obesidad, el PCOS y la periodontitis (104,105). En la periodontitis, el estrés oxidativo se ha descrito principalmente en los tejidos gingivales, la saliva y el GCF. Los niveles elevados de ROS son el resultado de la inflamación inducida por los neutrófilos (que producen grandes cantidades de H₂O₂, NO, O₂⁻, HO y HOCl) en consecuencia del ataque producido por las bacterias periodontopatógenas. A nivel celular, la progresión de ROS comienza con la peroxidación de los lípidos de la membrana seguida de la modificación de las

proteínas citosólicas y termina con la oxidación del DNA. La peroxidación lipídica está mediada por el radical HO e induce la formación de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) y malondialdehído (MDA) y, siendo este último uno de los biomarcadores más utilizados para evaluar el daño oxidativo (106). A nivel salival y GCF existen compuestos antioxidantes que intentan compensar el efecto de las ROS (como la albúmina, peróxido dismutasa, glutatión peroxidasa y catalasa entre otras) pero sin éxito en el caso de los pacientes con periodontitis activas establecidas (90,106).

Las ROS pueden inducir la destrucción del tejido periodontal, que está asociada con la reabsorción ósea osteoclástica y producen daño directo e indirecto a los tejidos periodontales. Mientras que los daños directos incluyen peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y del DNA, los indirectos involucran la regulación de las vías de señalización del NFκB, la vía de la quinasa, vías de activación del inflammasoma y autofagia provocando la destrucción tisular y exacerbación de la respuesta proinflamatoria en la periodontitis.

La proteína JNK1 está implicada en apoptosis, diferenciación celular y proliferación, procesos inflamatorios y producción de diversas citoquinas mediada por el factor de transcripción AP-1, tales como RANTES, IL8 y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF [del inglés, Recombinant Human Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor]). De igual modo, la JNK1 ha demostrado estar implicada en la regulación de la proteína Jun mediante fosforilación y activación de la ubiquitín ligasa. Las proteínas JNKs pueden asociarse con proteínas estructurales, así como con las quinasas JNKK1 y JNKK2 continuando el proceso de activación de los mecanismos proinflamatorios actuando sobre receptores nucleares. Las JNKs modifican mediante fosforilación la actividad de numerosas proteínas que residen en la mitocondria o en el núcleo, con lo que regula diversas e importantes funciones celulares. Entre los diferentes estímulos que pueden activar a las JNKs cabe destacar las señales inflamatorias y variaciones en los niveles de las ROS, estando ambos estímulos presentes en los pacientes con periodontitis.

Tratamiento periodontal

El tratamiento periodontal consiste en reducir la placa bacteriana supragingival y subgingival, además de control de los factores de riesgo del paciente, así como la formación del paciente para que sea capaz de mantener un buen control de placa bacteriana. Para ello se puede dividir el tratamiento en las siguientes etapas: historia clínica, información e instrucciones de higiene oral, detartraje, tratamiento periodontal no quirúrgico, que consiste en el raspado y alisado radicular (SRP [del inglés, Scaling and Root Planing]) y tratamiento periodontal quirúrgico (por medio de cirugía periodontal resectiva y regenerativa) (107).

Historia clínica, información al paciente e instrucciones de higiene oral

Es una de las etapas más complejas porque de ella depende en gran parte el éxito del tratamiento periodontal a largo plazo. En la historia clínica buscaremos sobre todo la presencia de factores de riesgo y las posibles comorbilidades asociadas a las PDs. Se debe de instruir al paciente con una correcta técnica de cepillado dental e higiene interproximal (con hilo dental, o cepillos interproximales) para que sea capaz de mantener un nivel de placa bacteriana bajo. Además, hay que enseñarle al paciente las causas de la gingivitis y periodontitis para que sepa sobre qué factores de riesgo puede influir, como es el tabaco y la higiene oral. También se le tiene que dar gran importancia a las visitas de mantenimiento. El paciente tiene que saber que las visitas de mantenimiento periodontal son muy importantes para poder conseguir la mejoría periodontal y el control de las PDs (108).

Detartraje

Es el tratamiento de elección en el caso de las gingivitis asociadas a placa bacteriana. Aunque existe la técnica manual con curetas y cinceles, la más utilizada es por medio de dispositivos sónicos o ultrasónicos. En el caso de los ultrasonidos, se consigue retirar la placa con una frecuencia de entre 21-32 kHz, que despega por vibración la placa bacteriana adherida al diente. Se emplean puntas específicas metálicas, que se refrigeran por agua, evitando así el sobrecalentamiento de la superficie del diente. Es una técnica que permite retirar la placa supragingival, por lo cual en aquellos casos en los que exista placa

bacteriana por debajo del margen gingival, no conseguiremos retirar la totalidad de la placa más allá del surco gingival. Como coadyuvante al detartraje, se asocia el control químico de la placa bacteriana, por medio de enjuagues bucales al 0,12% de digluconato de clorhexidina durante 1 minuto, 2-3 veces al día, durante 15 días (109,110). Este compuesto se caracteriza por su acción antiséptica de amplio espectro, bactericida y fungicida. Ha sido recomendado por los últimos estudios, y metaanálisis como coadyuvante de elección en aquellos pacientes que presenten inflamación gingival. También ha sido recomendado su uso previo al detartraje en aquellos pacientes que presentan sangrado y molestias, para reducir la inflamación previo al tratamiento (109).

Tratamiento periodontal no quirúrgico

El SRP es un procedimiento mecánico, que consiste en retirar la placa subgingival con curetas periodontales (Gracey o universales) tras en sondaje periodontal de cada uno de los dientes. Estas curetas consiguen adaptarse a la superficie de la raíz de los dientes para despegar el cálculo adherido. Se introducen en la bolsa periodontal, accediendo desde el margen gingival, sin la necesidad de realizar un colgajo. Este tratamiento se realiza con anestesia local, se inicia con la fase de raspado con movimientos cortos, potentes, controlados y superpuestos con ángulos de entre 45-90°. Posteriormente, se procede al alisado radicular, colocando la cureta con un ángulo de 45-60°. En este caso se realizarán movimientos repetidos y suaves para dejar la superficie radicular lisa, y comprobar que no hay restos de cálculo. Puede realizarse en varias sesiones (SRP por cuadrantes, dividiendo el tratamiento en 2 o 4 citas) o en una sola sesión (full-mouth). Recientes investigaciones han planteado, que aunque es probable obtener buenos resultados en ambos planes de tratamiento, se consigue una mejoría en menor tiempo, y con mayor confort para el paciente, si se realiza el SRP full-mouth (111–113).

Tratamiento periodontal quirúrgico

Si con el SRP no conseguimos dejar la superficie radicular libre de placa bacteriana, será muy difícil que se consiga una nueva unión epitelial. Es necesario generar una superficie radicular limpia para que el ligamento periodontal se vuelva a adherir a las células del cemento radicular que cubren la

superficie de la raíz. La evolución deseada será la ganancia de inserción junto con la reducción del PPD y BOP. Sin embargo, en ocasiones la disminución de la inflamación y la reducción de la bolsa, conlleva la exposición de una mayor superficie radicular por recesión gingival posterior al SRP. Si tras las sesiones de revisión y mantenimientos periodontales no conseguimos la mejoría periodontal deseada, procederemos a evaluar el caso para planificar el tratamiento quirúrgico. Dentro de las opciones terapéuticas quirúrgicas, encontramos la cirugía periodontal a cielo abierto, la cirugía resectiva y las técnicas regenerativas.

La cirugía a cielo abierto consiste en realizar el SRP con una visión directa de la bolsa. Teniendo acceso a esos espacios que no pudimos desbridar correctamente en las sesiones no quirúrgicas de SRP. Se exploran los defectos verticales, zonas de bolsas muy profundas y estrechas, furcas, curvaturas y depresiones radiculares, etc. En este caso, se levanta un colgajo, se realiza el SRP y se sutura. No se llevan a cabo modificaciones de tejido blando ni del hueso, aunque pueden haberlas, por consecuencia de la reposición del colgajo y del propio tratamiento.

La cirugía resectiva se realiza de la misma forma, pero en este caso tras limpiar bien las superficies con cálculo, se diseña el remodelado del hueso (osteoplastia), de forma que se consiga mejorar aquellos defectos óseos presentes. En consecuencia, se debe de retirar tejido blando, y se reposiciona el colgajo. Esta retirada de tejido para la reducción de los defectos residuales, a nivel periodontal va a conseguir un mejor control de la periodontitis, pero, probablemente, exista un empeoramiento de la estética del paciente. El objetivo es dejar una PPD menor, que sea factible para realizar posteriores mantenimientos periodontales no quirúrgicos, generando el menor defecto estético posible. Siempre se debe considerar el aspecto estético del paciente, prever los defectos que se generarán, consensuarlo, y trabajar coordinadamente con un odontólogo con conocimientos en prostodoncia, para poder rehabilitar al paciente en su conjunto (cierre de espacios interdentes, coronas que adapten al nuevo margen gingival, etc.).

Las técnicas de regeneración pueden ser para conseguir un aumento de tejidos blandos (conectivo-epitelial) y/o de tejido óseo. Dependiendo de la necesidad de

tratamiento que presente el paciente, se seleccionará la técnica más adecuada o la combinación de estas.

*Técnicas de recubrimiento cervical por sensibilidad y/o estética: se engloban en este tipo de técnicas la cirugía mucogingival. Se emplean injertos de tejido conectivo, epitelial o ambos. El principal objetivo es cubrir la zona expuesta de la raíz dental, que se han quedado al descubierto por recesión gingival, por motivo estético y/o sensibilidad dental. La zona donante del injerto suele ser el tejido del paladar, o el tejido de la tuberosidad del maxilar y/o, colocar biomateriales que simulan el tejido conectivo. Unos de los más conocidos son, la matriz de colágeno tipo I/III derivada de la dermis porcina (114) (Mucorderm®) y las proteínas derivadas de la matriz del esmalte (115) (Emdogain®) de origen porcino.

*Técnicas de regeneración de defectos óseos: se trata de ganar tejido óseo en aquellos defectos regenerables. En este caso, hay que estudiar al paciente con el uso de técnicas radiográficas que nos permitan estudiar y conocer la magnitud del defecto en las 3 dimensiones (tomografía computerizada axial (CAT [del inglés, Computerized Axial Tomography]) o de haz cónico (CBCT [del inglés, Cone Beam Computed Tomography])(116). Para ello, se clasificará el defecto óseo según sea su extensión, tomando como referencia que los dientes están rodeados por 4 paredes de hueso (vestibular, lingual/palatino, mesial y distal).

La clasificación de defectos intraóseos de Goldman y Cohen 1958 define 3 tipos de defectos: defecto de 3 paredes: rodeado por tres paredes óseas, la superficie radicular será una cuarta pared; defecto de 2 paredes: es el más común en la zona interdental, defecto de 1 pared: suele ser interdental y defecto circunferencial: cuando existe pérdida ósea alrededor de todo el diente (117). Teniendo en cuenta esta clasificación, numerosos estudios han propuesto como defectos regenerables (mejores candidatos para la regeneración), con alta tasa de éxito y predecibles, los defectos de 3 paredes (estrechos y profundos) (117–120). Para la regeneración de los defectos se puede emplear aloinjertos, xenoinjertos, injertos heterólogos (sobre todo porcino (MatrixOss™, Tissum®, porcino anaorgánico como el Bio-Oss®) y aloplásticos con capacidad osteoinductora (Novabone®-Morsels) (117).

Coadyuvantes químicos

El coadyuvante más empleado en los tratamientos no quirúrgicos y quirúrgicos, por su evidencia científica, es el digluconato de clorhexidina por medio de enjuagues bucales, como ya hemos comentado anteriormente (109,110). Además, se pueden emplear antibióticos dentro de la bolsa periodontal como es la terramicina a bajas concentraciones en pomada, y el tratamiento de la superficie radicular con gel de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) al 24% durante 1 min en los procedimientos quirúrgicos (121). El antibiótico por vía oral, es un tema controvertido, porque la justificación depende de diversos factores como la presencia de patologías sistémicas del paciente, los abscesos periodontales, las cirugías muy amplias, entre otros; pero como norma general, no está recomendado prescribirlo de manera rutinaria (122,123). La pauta más común en los tratamientos periodontales es el uso combinado de amoxicilina (750 mg) con metronidazol (250 mg), durante 7-10 días (122). Para combatir el uso de antibióticos vía oral, se ha propuesto el uso de dispositivos de liberación lenta de antisépticos dentro de la bolsa periodontal (Periochip©) (124). Se colocan dentro de la bolsa y liberan 2,5 mg de digluconato de clorhexidina durante 7 días, disolviéndose sin necesidad de retirarlo. La eficacia del uso de estos dispositivos de liberación dentro de la bolsa periodontal, es controvertida, existiendo poca unanimidad entre los beneficios reales frente al uso de los enjuagues bucales y la antibioticoterapia vía oral (123–125).

Revisiones y mantenimiento periodontal

Las revisiones son parte del tratamiento, dado que de ellas depende en gran parte el éxito del tratamiento. El paciente debe de tener un seguimiento para garantizar que está consiguiendo un correcto control de la placa bacteriana y que mantiene la motivación necesaria para conseguir el control de la enfermedad (107,126–128). Por otro lado, la salud del paciente es un proceso dinámico (tanto a nivel sistémico como periodontal), por lo cual, las necesidades de tratamiento a lo largo del tiempo pueden ir cambiando. En estas citas, actualizaremos la historia clínica del paciente, haremos el periodontograma y la exploración bucodental completa. Dependiendo de su evolución, el paciente puede necesitar repetir las sesiones de, tartrectomía, SRP, o en los casos de reactivación de la inflamación e infección, realizar un nuevo plan de tratamiento. En el caso de que

haya habido una buena evolución, se suele hacer el SRP en una única sesión, de las zonas que presenten bolsas sangrantes, bolsas profundas y de todas aquellas zonas que presenten acúmulos de placa bacteriana supra y subgingival (mantenimiento periodontal). Se aconseja que estas citas sean tras el 1º mes de tratamiento, a los 3 meses, 6 meses, y al año. La periodicidad de las citas dependerá los síntomas y signos de inflamación, el control de placa bacteriana y de las particularidades de cada paciente (107,126–128).

Asociación entre periodontitis y enfermedad cardiometabólica

- obesidad y aterosclerosis –

Ciertas revisiones sistemáticas y metaanálisis (129–131) han demostrado una asociación entre la periodontitis y la obesidad. Se sabe que el tejido adiposo actúa como un órgano endocrino activo en el cual los adipocitos secretan varias citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL1, IL6) y hormonas (adiponectina, leptina y resistina) contribuyendo a la patogénesis de las PDs (132). Su liberación está estrechamente relacionada con una mayor susceptibilidad a la infección bacteriana, causada por una alteración en la respuesta inmune del huésped (133). De hecho, los niveles altos de leptina en la obesidad podrían participar en la disfunción de la inmunidad innata al promover la polarización de los macrófagos M1 a través de NLRP3 (134) agravando así la periodontitis.

Uno de los mecanismos fisiopatológicos que vinculan la obesidad con la periodontitis es la producción de ROS por parte del tejido adiposo, siendo capaz de inducir un estado de estrés oxidativo sistémico que desempeña un papel en la progresión de periodontitis (135,136). Además, la IR presente en la obesidad, genera un incremento de las citoquinas proinflamatorias y contribuye a la inflamación crónica de bajo grado presente en la periodontitis. La IR se ha asociado con diferentes parámetros de infección periodontal (137–140), y con la prevalencia (55,141) y extensión de periodontitis (28,142). Un estudio preliminar, que hemos llevado a cabo en nuestro grupo de investigación, mostró que los pacientes obesos con IR pueden desarrollar una periodontitis más extensa que los obesos que no presentan IR. De hecho, observamos que los pacientes obesos con IR tenían mayor número de dientes con afectación periodontal que los obesos sin IR, incluso al mismo índice de masa corporal (BMI, del inglés

[Body Mass Index]), sugiriendo que la IR desempeña un papel en la patogénesis de la infección periodontal (28).

Por otro lado, la presencia de obesidad basal también podría estar alterando la respuesta inmune adquirida a través de la desregulación de la respuesta de los linfocitos B y células T, promoviendo la aparición y progresión de la periodontitis crónica y, provocando una respuesta deficiente al tratamiento periodontal (143,144).

Estudios epidemiológicos han demostrado que la periodontitis puede desempeñar un papel en las enfermedades CV ateroscleróticas subclínicas en humanos (145,146). De hecho, la inflamación sistémica causada por la periodontitis contribuye al desarrollo y mantenimiento de la aterosclerosis, que está precedida por la disfunción endotelial (147). La primera etapa de la disfunción endotelial se caracteriza por el movimiento y la acumulación de leucocitos en la pared del vaso, que están mediadas por las moléculas de adhesión intercelular (ICAM1 [del inglés, Intercellular Adhesion Molecule 1]) expresadas en los leucocitos y/o las células endoteliales. Aunque, recientemente, se ha constatado una asociación significativa entre la periodontitis y la disfunción endotelial (91,148).

Esta asociación entre periodontitis y enfermedad CV fue descrita por primera vez por Mattila *et al.* (149) y confirmado por varios informes epidemiológicos (145,146) sugiriendo que la periodontitis es anterior al proceso aterosclerótico (150). Los mecanismos que vinculan la periodontitis y la aterosclerosis no se han aclarado por completo, aunque la respuesta inflamatoria exacerbada y la producción ROS en la periodontitis parecen desencadenar una lesión vascular y disfunción endotelial, lo que lleva a la aterosclerosis y las complicaciones CV (147).

La disfunción endotelial en pacientes con periodontitis, ha sido estudiada en numerosas ocasiones, además de investigarse la posible influencia del control de la periodontitis (con el tratamiento periodontal no quirúrgico) sobre la disfunción endotelial (35,151,152). De hecho, se ha establecido una posible asociación entre la inflamación subclínica crónica (presente en las PDs) y cambios vasculares y endoteliales. Amar *et al.*, (151) en 2003, realizaron un estudio de casos y controles en el que se midió la disfunción endotelial en

pacientes con y sin periodontitis. Esta disfunción fue determinada mediante parámetros como la elasticidad vascular y la permeabilidad capilar que regulan la homeostasis vascular. La vasodilatación está frecuentemente asociada con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y antitrombóticas, y la vasoconstricción suele asociarse a un estado prooxidante, proinflamatorio y protrombótico (153). El estudio, demostró como los pacientes con periodontitis, presentaron menor elasticidad vascular, y un aumento de la permeabilidad vascular, asociándose a un estado proinflamatorio y protrombótico, aumentando así la susceptibilidad del paciente con periodontitis ante los eventos tromboticos y CV (151).

Tonetti *et al.*, (152) en 2007 realizaron un ensayo clínico aleatorizado en el que se demostró cómo, el tratamiento periodontal no quirúrgico en los pacientes con periodontitis severa, mejoraba la función endotelial. Se determinó un aumento del flujo medio sanguíneo, y el aumento del diámetro vascular medido en la arteria braquial, después del SRP.

Se cree que la proteína C reactiva (CRP [del inglés, C Reactive Protein]) desempeña un papel en la aterogénesis debido a su capacidad de unirse a lipoproteínas de baja densidad (LDL [del inglés, Low Density Lipoprotein]) modificadas y a su efecto sobre la función de las células endoteliales, la inestabilidad de la placa de ateroma y la trombosis. Ciertos estudios, han documentado que los niveles séricos de CRP están elevados en la periodontitis (53,151,152). Sin embargo, los efectos de la terapia periodontal sobre este y otros marcadores inflamatorios sistémicos son variables, especialmente cuando el tratamiento periodontal no quirúrgico se realiza en pacientes con un BMI elevado (≥ 30 kg/m²), ya que la obesidad actúa como un factor comórbido que también contribuye a aumentar los niveles de CRP (90,152,154). Los estudios recientes sobre la asociación de la CRP con la periodontitis y la enfermedad CV, no han aclarado sustancialmente el papel o la importancia de este marcador. Por ejemplo, las mediciones del área de la íntima-media carotídea mediante ultrasonografía en pacientes con o sin periodontitis no revelaron ningún impacto de los niveles de CRP en el área de la íntima-media carotídea, pero sí demostraron una asociación de la periodontitis con esta determinación de riesgo de aterosclerosis (90,154).

El fibrinógeno, también ha sido vinculado con la obesidad, la periodontitis y la disfunción endotelial (90,155,156). Es una glucoproteína que se sintetiza principalmente en el hígado y cuya función principal en la coagulación es transformarse por acción de la trombina en fibrina insoluble. Se utiliza como biomarcador de inflamación dado que, en respuesta a la presencia de un estado inflamatorio, puede incrementar de 2 a 20 veces su valor. Está implicado en la inflamación, la aterogénesis y la trombogénesis (157).

En el proceso de aterogénesis, el fibrinógeno y sus metabolitos inducen disfunción endotelial por medio de la liberación de mediadores vasoactivos por su unión a las células endoteliales. El fibrinógeno, interviene en la modulación de la permeabilidad del endotelio, favoreciendo la migración de estas células, reforzando su depósito en el espacio subendotelial. También participa en la proliferación y quimiotaxis en el músculo liso y en la proporción de superficie de absorción para acumulación extracelular de LDL, que facilita su transferencia a los macrófagos, mecanismo fundamental en la formación de células espumosas (157–159).

El exceso de fibrinógeno se asocia a un aumento de la viscosidad de la sangre (dado que es el mayor determinante de la agregación eritrocitaria) y su incremento interfiere con la microcirculación, de forma que la reducción de la velocidad de flujo celular, genera una mayor fricción y puede producir daño endotelial y trombosis (158).

El fibrinógeno se une a las ICAM1 y potencia la interacción entre los leucocitos y las células endoteliales, aumentando la respuesta inflamatoria. Fortalece la adhesión de los leucocitos al endotelio, contribuye a la agregación plaquetaria y se asocia con la proliferación celular (157,158). En pacientes obesos se ha constatado un aumento en la expresión génica y proteica de ICAM1 y de moléculas de adhesión vascular (VCAM [del inglés, Vascular Cell Adhesion Molecule]) en el tejido adiposo visceral (160) que se asoció a mayores niveles séricos de estas moléculas (161). El aumento de los niveles séricos de estas moléculas, también se ha relacionado con la presencia de periodontitis, cuyo tratamiento podría reducir la concentración de ambas en suero (162).

El papel de las bacterias periodontopatógenas en la formación de placas de ateroma también ha sido estudiado. La liberación sistémica del LPS procedente

de los periodontopatógenos, provoca la activación las células endoteliales que expresan moléculas de adhesión como VCAM e ICAM y la migración de leucocitos hacia la pared del vaso, lo que constituye la etapa inicial del proceso aterosclerótico. Tras su infiltración en el espacio subendotelial, estas células, exacerbaban la respuesta inflamatoria y oxidativa, y los macrófagos inician la captación de moléculas de LDL, produciéndose un remodelado de la pared que ocluye progresivamente la luz del vaso incrementando el riesgo de infarto o ictus (163). De hecho, el análisis de placas ateroscleróticas ha revelado presencia de DNA bacteriano, que se correlaciona con el número de leucocitos infiltrados (164). Por el contrario, el tratamiento periodontal no quirúrgico mejoró los marcadores inflamatorios y oxidativos sistémicos y ejerció un papel protector contra la disfunción endotelial (152).

Otro de los parámetros que ha estudiado nuestro grupo de investigación, es la influencia de la periodontitis sobre los parámetros de disfunción endotelial mediada por la hiperactivación de leucocitos. Hemos demostrado que los leucocitos de los pacientes con periodontitis presentan hiperreactividad y producen mayores cantidades de superóxido, lo que probablemente contribuye al mayor flujo de rodamiento y a la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular que se observa en estos sujetos (53).

Se ha demostrado como los pacientes obesos con un aumento de la grasa abdominal pueden presentar una elevada concentración de fibrinógeno, existiendo también una correlación significativa con la edad y las partículas de LDL (pequeñas y densas) (155). Al mismo tiempo, se ha constatado como la presencia de periodontitis puede aumentar el fibrinógeno en sangre y contribuir así al riesgo CV del paciente (90). Este hecho, nos hace pensar en que, el riesgo CV en un paciente que presente ambas enfermedades (periodontitis y obesidad), puede verse elevado por compartir biomarcadores relacionados con la disfunción endotelial, la aterosclerosis y la trombosis (figura 5).

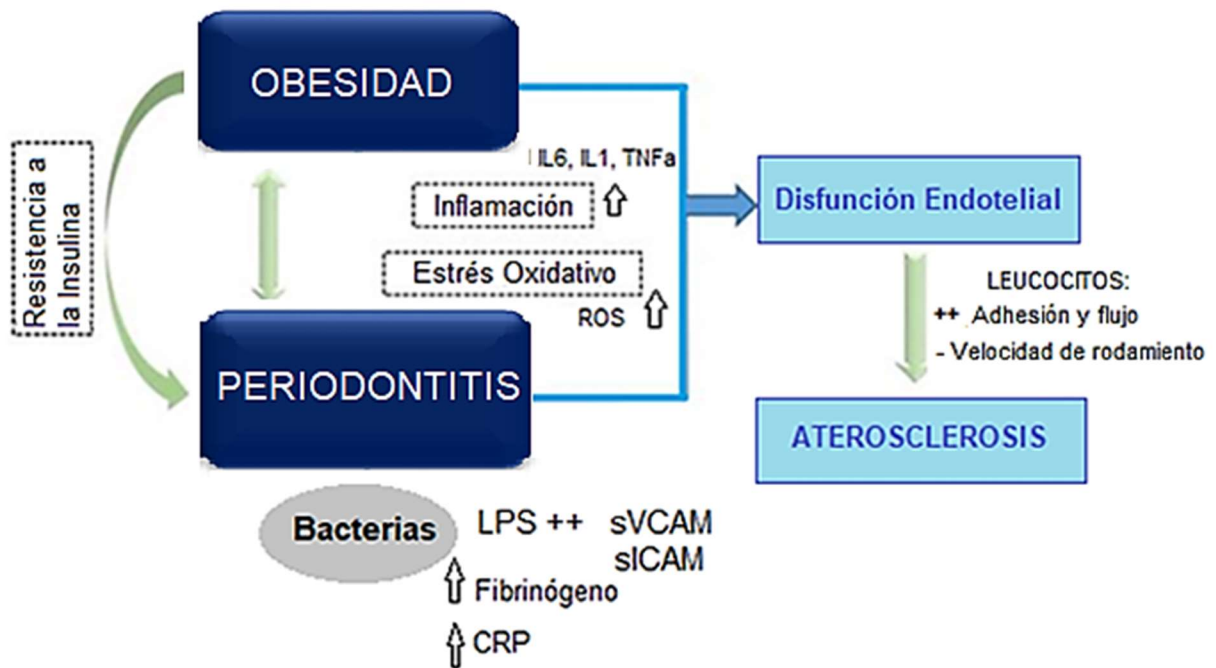


Figura 5. Modelo de asociación entre obesidad, periodontitis y disfunción endotelial. La obesidad aumenta el riesgo de desarrollar periodontitis, que tiende a ser más pronunciada en presencia de RI asociada. CRP: proteína C reactiva; IL1: interleuquina 1; IL6: interleuquina 6; LPS++: aumento de lipopolisacáridos de origen bacterianos; ROS: especies reactivas de oxígeno; sICAM: moléculas solubles de adhesión intercelular; sVCAM: moléculas solubles de adhesión vascular; TNFα: factor de necrosis tumoral alfa. Fuente: elaboración propia.

Además, la inflamación sistémica y el estrés oxidativo convergen en ambas patologías, lo que conduce a una disfunción endotelial y, eventualmente, al desarrollo de aterosclerosis.

Tal y como hemos mencionado previamente, dado que el PCOS es uno de los síndromes que presentan IR (89), alteraciones cardiometabólicas (165,166) e inflamación crónica de bajo grado (167) como ocurre en la obesidad, los mecanismos fisiopatológicos que vinculan la obesidad con la periodontitis podrían ocurrir también entre el PCOS y las PDs.

Síndrome de ovario poliquístico

Concepto y diagnóstico

El PCOS, es el trastorno endocrino complejo más frecuente en mujeres en edad fértil (167) de etiología multifactorial que se caracteriza por la presencia de anovulación crónica, hiperandrogenismo y ovarios de apariencia ecográfica poliquística. La primera organización que quiso regular el diagnóstico de PCOS para que existiera unanimidad de criterios fue el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH [del inglés, National Institutes of Health]). En 1990, el NIH propuso como diagnóstico de PCOS la existencia de hiperandrogenismo y anovulación crónica, siendo necesaria la presencia de ambos factores y sigue siendo muy utilizado en Estados Unidos (168). En mayo del 2003, en Róterdam, tuvo lugar la reunión de expertos que estableció por consenso los criterios diagnósticos vigentes a día de hoy: presencia de oligo y/o anovulación, signos clínicos y/o bioquímicos de hiperandrogenismo y ovarios de apariencia ecográfica poliquística (se exige por lo menos alguno de estos dos criterios: presencia de 12 o más folículos de 2 a 9 mm de diámetro y volumen ovárico superior a 10 cm³) (figura 6). Se consensuó que para establecer el diagnóstico de PCOS, tienen que cumplirse al menos dos de los tres criterios (169).

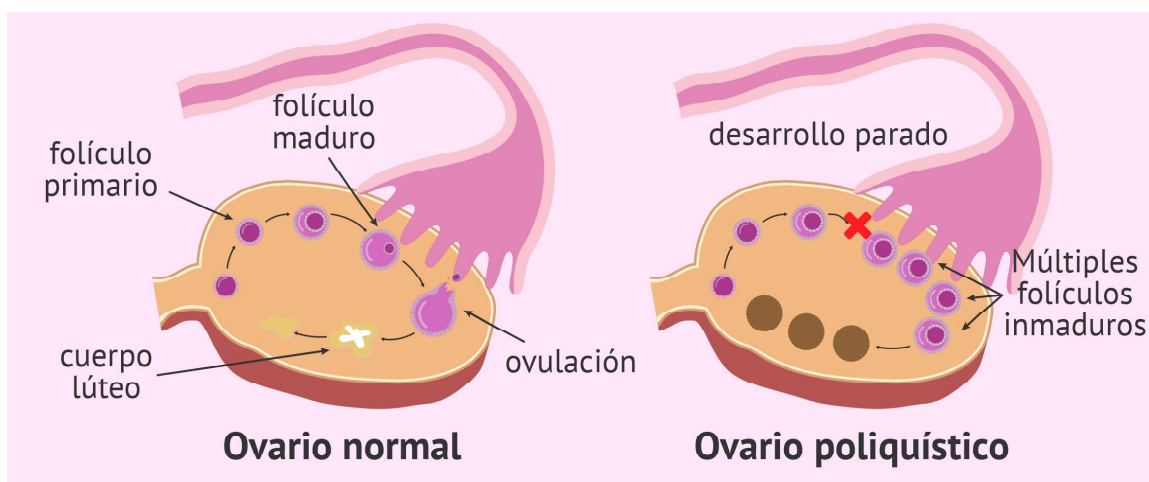


Figura 6. Proceso de ovulación normal en el ovario vs. fallo en la selección del folículo a madurar en la ovulación, generándose la presencia de múltiples folículos maduros que generan quistes visibles en una exploración ecográfica. Fuente: Reproducción Asistida, ORG- acreditada por el Colegio de Médicos de Barcelona (170).

Existen también otros criterios de diagnóstico, como el de la Sociedad de PCOS y Exceso de Andrógenos (AE-PCOS [del inglés, Androgen Excess and PCOS Society]), sociedad internacional interesada en tipificar los fenotipos de PCOS, que estableció sus criterios en el año 2006 (171) valorando la presencia de hiperandrogenismo y disfunción ovárica, caracterizando los fenotipos según factores clínicos (la disfunción ovárica y la presencia/ausencia de quistes en ovarios) y bioquímicos a evaluar (exceso de andrógenos y etiología).

La Asociación Americana de Endocrinólogos Clínicos, el Colegio Americano de Endocrinología (ACE [del inglés, American College of Endocrinology]) y la AE-PCOS, publicaron en 2015 (172) una guía elaborada en colaboración de las tres entidades en la que se aconseja para el diagnóstico de PCOS el criterio de Róterdam, coincidiendo con la Guía Internacional Basada en la Evidencia Científica coordinada por la oficina de estrategias de control de enfermedades del NIH (DPCPSI [del inglés, Division of Program Coordination, Planning, and Strategic Initiatives]) (173,174). Por ello, se establece como criterio diagnóstico más aceptado el definido en el Consensus de Róterdam, por permitir cuantificar y tipificar los casos de una forma menos restrictiva.

Basándose en el Consensus de Róterdam se establecen los siguientes criterios de diagnóstico según cuatro posibles fenotipos en adultos (169,175):

- A: 1. Evidencia clínica y/o bioquímica de hiperandrogenismo
2. Evidencia de oligo-anovulación
3. Evidencia ecográfica de ovario poliquístico
- B: 1. Evidencia clínica y/o bioquímica de hiperandrogenismo
2. Evidencia de oligo-anovulación
- C: 1. Evidencia clínica y/o bioquímica de hiperandrogenismo
2. Evidencia ecográfica de ovario poliquístico
- D: 1. Evidencia de oligo-anovulación
2. Evidencia ecográfica de ovario poliquístico

Todos los fenotipos involucran la exclusión de otras causas de hiperandrogenismo y anovulación. La AE-PCOS solo reconoce los fenotipos androgénicos (no el fenotipo D). El fenotipo clásico sería el A, el B es el criterio

esencial del NIH, el C es el fenotipo de PCOS ovulatorio, y el D es el PCOS no hiperandrogénico.

Para el diagnóstico en adolescentes se establecen los siguientes criterios (176):

1. La combinación sin otra causa explicable de un patrón anormal de sangrado uterino: a. anormal para la edad o para la edad ginecológica; b. síntomas persistentes para el punto 1 y 2.
2. Evidencia de hiperandrogenismo: a. evaluación persistente de testosterona en sangre con un laboratorio de referencia; b. el hirsutismo moderado-severo como evidencia clínica de hiperandrogenismo; c. acné vulgar inflamatorio moderado-severo como indicador de hiperandrogenemia.

Epidemiología

A la hora de cuantificar la prevalencia del PCOS, es necesario tener en cuenta el criterio empleado para el diagnóstico. La prevalencia de PCOS oscila desde un 9% si se diagnostica según los criterios del NIH (168,177), hasta un 23% si se tienen en cuenta los criterios de Róterdam (168,169,178,179).

Además de los criterios de diagnóstico empleados, el área geográfica también modifica la prevalencia del PCOS. En Estados Unidos, se ha llegado a registrar una prevalencia de un 47,5% en una población del sur, mientras que en otras zonas del país la prevalencia oscila entre un 10,3 % en la zona noreste, y un 23% en la zona centro. En su conjunto, Estados Unidos en uno de los países que presenta mayor prevalencia de PCOS (180). Este hecho, se ha asociado con la alta prevalencia de la obesidad y su relación con el PCOS (168).

En cuanto a España, Asunción *et al.*, (181) en el año 2000, llevaron a cabo un estudio de la prevalencia de las diferentes patologías del sistema endocrino, empleando datos de diagnóstico de hospitales de Madrid. Determinaron que, alrededor de un 6,5% de las mujeres que habían acudido por patologías hormonales a consulta médica, presentaron el PCOS. Solo se registraron aquellos casos que habían sido confirmados con los criterios del NIH y con hiperandrogenismo en el perfil sanguíneo (181).

La prevalencia determinada en España, coincide con la determinada en México por Moran *et al.*, (182) en el año 2010, existiendo una prevalencia de 6% de PCOS, utilizando los criterios NIH.

En Australia también se determinó una alta prevalencia del PCOS, llegando a registrarse un 26% de PCOS en mujeres indígenas australianas (183). Esta elevada prevalencia en relación con las caucásicas se atribuye a los cambios de hábitos de vida en esta población indígena, al adaptarse al entorno de las grandes ciudades, como es la vida sedentaria y la dieta rica en grasas saturadas (183). En este caso, el diagnóstico se realizó mediante la presencia de oligomenorrea e hirsutismo y/o hiperandrogenismo. Como hemos podido comprobar, la diferencia en la prevalencia del PCOS, se ve influenciada por el criterio diagnóstico y el área geográfica, existiendo gran variabilidad entre diferentes países del mundo.

Bases patogénicas y fisiopatología

La hipótesis patogénica más estudiada, indica que sobre unos ovarios de morfología poliquística, la influencia de factores como la obesidad, la RI, el estrés oxidativo y la desregulación dopaminérgica, sería capaz desarrollar el síndrome mostrando la mayoría de las manifestaciones clínicas (184). Desde que se estableció el diagnóstico del síndrome, se han postulado numerosas teorías para explicar la alteración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que comparte mecanismo fisiopatogénicos, si bien, se diferencian en el origen de la disrupción endocrinometabólica según las posibles alteraciones primarias. Podríamos destacar la teoría central, la teoría ovárica, la teoría adrenal, la participación del sistema de los factores de crecimiento insulino-simil (IGF [del inglés, Insulin-like Growth Factors]) y sus proteínas transportadoras, la disrupción metabólica-periférica (mediada por IR), el desarrollo del PCOS en mujeres delgadas y obesas, la exposición prenatal a exceso de andrógenos y el origen genético (185).

Teoría central

Durante el ciclo menstrual se producen cambios en el endometrio y los ovarios, motivados por pulsos hormonales que se regulan por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Durante los primeros 5 días de ciclo (fase folicular y de menstruación) y hasta el día 14 (fase ovulatoria) comienza a haber un aumento de las hormonas ováricas e hipofisarias. A nivel hipofisario, se genera un pico en los pulsos de la hormona luteinizante (LH [del inglés, Luteinizing Hormone]), coincidiendo con el aumento de los estrógenos ováricos, que presenta una bajada de sus niveles en el momento de la ovulación, comenzando una subida de la progesterona. Seguidamente, disminuye la LH y comienza a subir la hormona estimulante del folículo (FSH [del inglés, Follicle Stimulating Hormone]) para conseguir un folículo maduro. En respuesta a estos estímulos, comienza a producirse un engrosamiento del endometrio en el útero (fase lútea), y si no se produce la fecundación, la progesterona y el estrógeno bajan y se comienza con un nuevo ciclo menstrual (figura 7 y 8).

En esta teoría, el origen del PCOS, consiste en una mala regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, existiendo un aumento de la secreción de la LH que es la encargada de estimular la producción de andrógenos en los ovarios, (precursores de los estrógenos) (figura 7). Como consecuencia también ocurre un descenso de la producción de la FSH, dado que ambas actúan de manera sinérgica. Este aumento de la secreción de LH, ocurre de forma secundaria a la alteración del mecanismo de retroalimentación entre la hipófisis y el ovario (186–188).

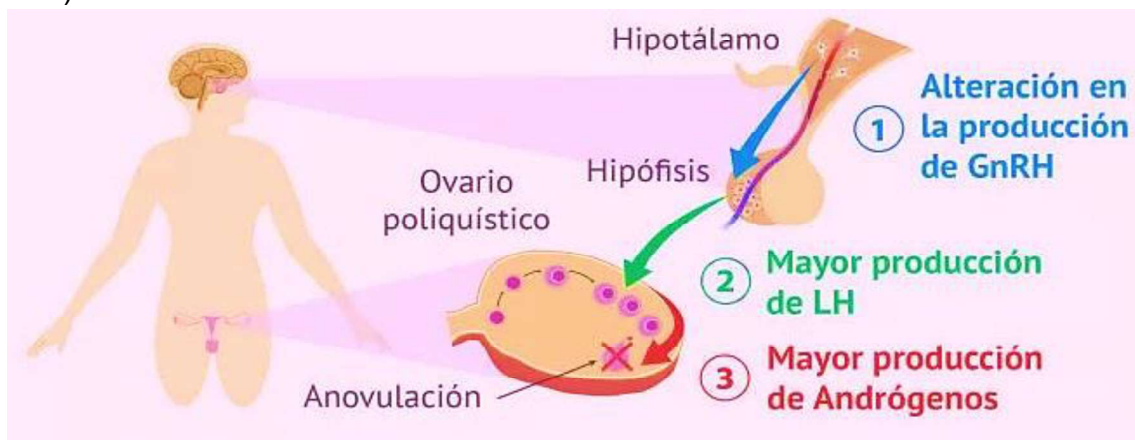


Figura 7. Alteración central causante de anovulación, por exceso de producción de GnRH a nivel hipotalámico. Fuente: Reproducción Asistida, ORG- acreditada por el Colegio de Médicos de Barcelona (170).

La causa del aumento de los pulsos de la hormona LH, no está clara, pero en esta teoría se podría atribuir a una causa primaria, a nivel hipotalámico, de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH [del inglés, Gonadotropin Releasing Hormone]), o a una alteración de la retroalimentación negativa de estrógenos y progesterona causada por el hiperandrogenismo (189,190) (figura 8).

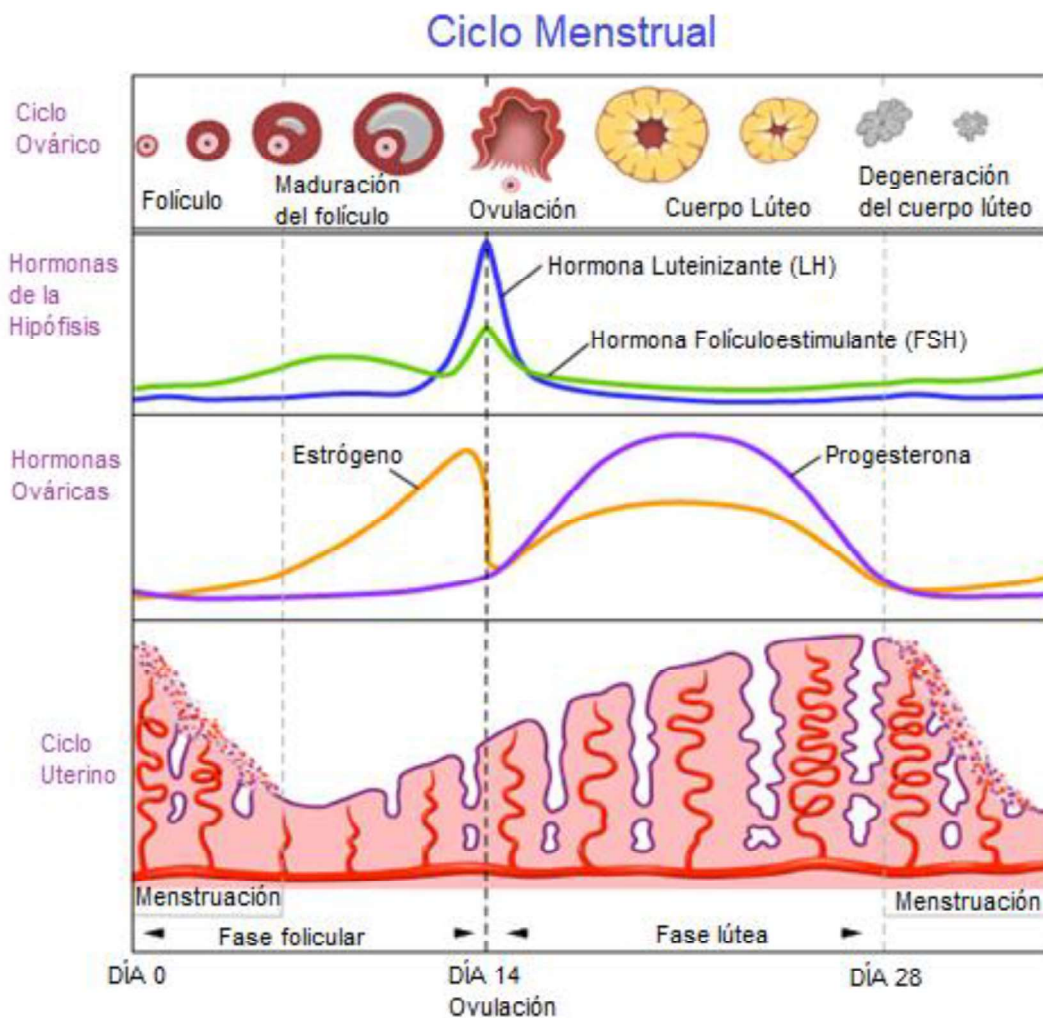


Figura 8. Ciclo menstrual, cambios hormonales y epiteliales en sus diferentes etapas y órganos implicados. Fuente: adaptada del banco de imágenes, Colegio Príncipe San Carlos, Colombia (191).

Teoría ovárica

En este caso, la hipótesis etiopatogénica se origina en una modificación de los epitelios que rodean al folículo ovárico, concretamente una hipertrofia tecal generando una superproducción de pulsos de la FSH, y un aumento de los

andrógenos. Existe un hiperandrogenismo ovárico funcional, que parece deberse al resultado hiperactivo de las células teca (células del estroma aplanado que forman una cubierta de revestimiento por encima de la lámina basal, del folículo ovárico maduro) que escapan a la regulación negativa (downregulation) de la esteroidogénesis. En el ovario se secretan diferentes hormonas, pudiendo distinguirse una liberación de LH de las células teca, y la hormona antimülleriana (AMH [del inglés, Anti-Mullerian Hormone]), estrógenos, FSH y progesterona de las células de la granulosa (figura 9).

Dicha hipertrofia de las células teca genera un aumento de la secreción de androstendiona (andrógeno de origen ovárico) dando lugar a un incremento de un “pool” androgénico y estrogénico, generando el descenso de la progesterona. En la pubertad temprana normal, el incremento nocturno en la frecuencia y amplitud de pulsos de LH produce una elevación de las concentraciones de estrógeno y progesterona que, al inhibir la GnRH, permite la secreción selectiva de FSH para la madurez normal folicular (188,192). En el caso del hiperandrogenismo, los pulsos nocturnos de estrógenos y progesterona son bajos y no consiguen inhibir el efecto de la LH, de esta forma se produce un deterioro del feedback negativo a nivel hipotalámico, causada por los esteroides ováricos.

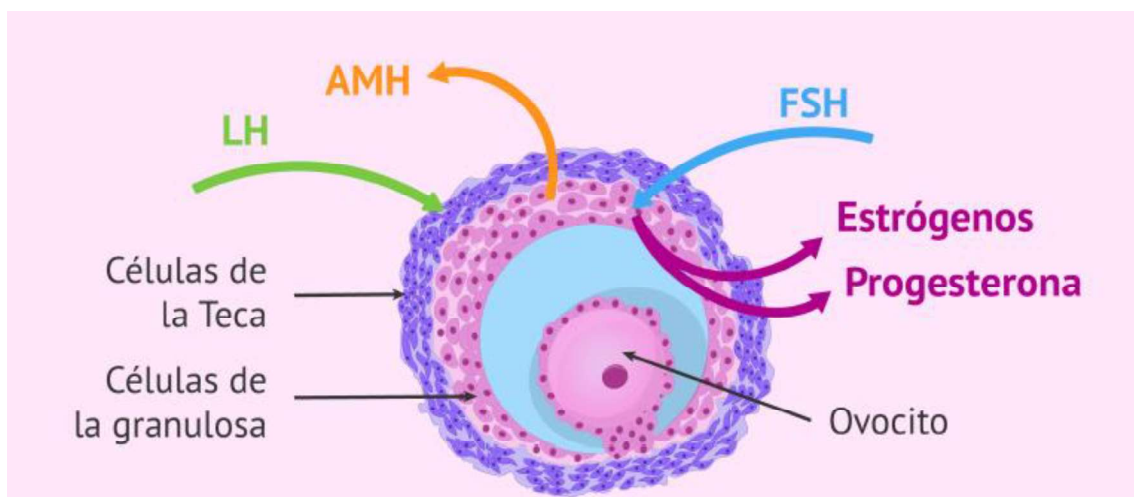


Figura 9. Epitelios secretores de hormonas a nivel ovárico. AMH: hormona antimülleriana; FSH: hormona folículoestimulante; LH: hormona luteinizante. Fuente: Reproducción Asistida, ORG- acreditada por el Colegio de Médicos de Barcelona (170).

Teoría adrenal

Además de esta regulación anormal de la secreción androgénica ovárica existe una regulación anormal suprarrenal (167). En este caso se le da mayor importancia a la alteración originada en las glándulas suprarrenales en la secreción de la hormona dehidroepiandrosterona (DHEA) y el sulfato de hidroxidehidroepiandrosterona (DEHAS) como precursores de testosterona y estrógenos. Este aumento podría deberse a una desregulación de la hormona de crecimiento (ACTH [del inglés, Adrenocorticotropic Hormone]) hipofisaria que actúa sobre la corteza de las glándulas suprarrenales, secretoras de cortisol y andrógenos. Este aumento de la ACTH puede generar una mayor producción de androstendiona ovárica y suprarrenal, y posteriormente testosterona y estrógenos.

Participación del sistema de los factores de crecimiento insulino-simil y sus receptores

Los IGF son péptidos con estructura y función similares a la insulina, de secreción principalmente hepática pero también ovárica. El control principal de su secreción es por la hormona de crecimiento (GH [del inglés, Growth Hormone]), pero a nivel ovárico su síntesis se controla con los pulsos de FSH. La vía de IGF-receptores bisfenol S (BPS [del inglés, Bisphenol S]) y proteasas de los receptores, está involucrada en la esteroidogénesis ovárica, el desarrollo y maduración del folículo seleccionado durante el ciclo menstrual. La síntesis de los IGF y BPS se realiza en las células de la granulosa. En el folículo seleccionado se detecta un aumento de la IGF1 libre, mientras que en los no seleccionados no se induce la diferenciación. En el PCOS se postula que el aumento de los pulsos de la LH (de las células de la teca), produce un aumento de las BPS en las células de la granulosa, bloqueando la acción de las IGF libre, llevando los folículos a la atresia y disminuyendo la producción de estrógeno (167,177,188).

Disrupción metabólica-periférica

La insulina es una hormona sintetizada por las células β de los islotes pancreáticos encargada de regular la glucemia que interviene el metabolismo lipídico y en la síntesis proteica entre otras funciones.

Como bien sabemos, la insulina tiene un gran campo de acción (tejido adiposo, músculo, hígado, ovario, etc.) siendo una hormona importante en la regulación del metabolismo. La IR se define como el estado en el cual los órganos diana no responden de manera normal al efecto de la insulina sobre ellos, generándose una hiperinsulinemia compensatoria (177). Dicha IR en PCOS contribuye al hiperandrogenismo y a la anovulación por los siguientes mecanismos: estimulación de la síntesis ovárica y suprarrenal de andrógenos, lo que disminuye la secreción de globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG [del inglés, Sex Hormone Binding Globuline]) por el hígado facilitando el incremento de andrógenos libres circulantes, produciéndose una acción directa sobre el eje hipotálamo-hipófisis y la consecuente alteración de secreción de gonadotrofinas (aumentando la LH) (30).

Por otro lado, la insulina sinérgicamente con la LH, promueve el crecimiento y formación de quistes ováricos y estimula a los receptores de LH en las células de la granulosa, convirtiéndolas en hiperrespondedoras en una etapa temprana en el desarrollo folicular. Este estímulo de la insulina, desencadena un efecto antiproliferativo al disminuir el número de células en relación al tamaño folicular. Además, el exceso de insulina genera una regulación a la alta de los receptores IGF1 y 2, lo que contribuye a la alteración de la maduración selectiva de un solo folículo, quedándose múltiples folículos inmaduros en el ovario (188). Otro de los hallazgos que vinculan la hiperinsulinemia con el desarrollo del hiperandrogenismo, es el manejo del paciente con la toma de metformina. Al tomar esta medicación (hipoglucemiante oral de tipo biguanida) se reduce considerablemente los niveles de andrógenos en sangre tanto en mujeres delgadas como obesas, y se relaciona con una disminución de la esteroidogénesis ovárica (167,188). Al mismo tiempo, el aumento del riesgo CV (por el estrés oxidativo y la disfunción endotelial) mediados por la IR (89), nos muestran la importancia que presenta esta condición de hiperinsulinemia en el origen de las patologías asociadas al PCOS.

Desarrollo del PCOS en mujeres delgadas y obesas

Existen diferencias en el desarrollo y las manifestaciones del PCOS según el BMI. Se ha encontrado mayor concentración de insulina y menor concentración de IGBP (del inglés, Insulin Growth Factor Binding Proteins) y SHBG en PCOS

con obesidad; mientras que en las PCOS delgadas encontramos mayor concentración de LH y GH. Aunque los mecanismos exactos no están descritos, estas diferencias, nos conducen a pensar en dos modelos de desarrollo del PCOS. Por un lado, en un contexto de obesidad, la hiperinsulinemia genera un aumento de la producción de andrógenos por medio de la estimulación de los IGF1, que en sinergia con la LH aumenta la actividad de la enzima P450c17 α , estimulando la producción de andrógenos (31,193). Mientras que en las PCOS delgadas se propone un origen desde el exceso de producción de GH, que estimularía la producción ovárica de IGF1 y en sinergia con la LH, aumenta la producción de andrógenos, al igual que ocurre en las obesas (52,167,175,194).

Además, también se ha estudiado como la pérdida de peso, mejora las manifestaciones clínicas de PCOS obesas, dándole de esta forma a la obesidad un papel importante en la fisiopatología del PCOS. También se relaciona la expresión del fenotipo del PCOS según el BMI. Se relaciona la anovulación crónica, la IR, un aumento de los esteroides sexuales y un aumento del riesgo cardiometabólico con la obesidad (155,195,196). La tendencia actual del aumento de la prevalencia de la obesidad a nivel mundial, se relaciona con una mayor prevalencia del PCOS en mujeres obesas, en países como Estados Unidos (180,197) y España (181).

Exposición prenatal a exceso de andrógenos

La hormona coriónica placentaria (HCG [del inglés, Human Chorionic Gonadotropin]) durante la gestación y la LH fetal, junto con genes reguladores de la esteroidogénesis, podrían generar un hiperandrogenismo ovárico fetal, que en las posteriores etapas del desarrollo (prepuberales y postpuberales) condicionen una disminución de los esteroides ováricos a nivel hipofisario. De esta forma se alteraría la secreción de LH, se generaría una tendencia a la obesidad, un estado de IR y anovulación (192,198). Ciertas investigaciones han podido establecer que las embarazadas con PCOS presentan niveles androgénicos significativamente más altos que las embarazadas sin dicho síndrome, lo que plantea la posibilidad que los hijos de estas mujeres pudieran haber estado sometidos a un ambiente esteroideo alterado durante su vida fetal, el cual podría afectar tanto al feto femenino como masculino. Actualmente, se

continúa investigando el efecto a largo plazo de este exceso de andrógenos prenatales sobre la descendencia de madres con PCOS (193,198) con el fin de establecer si el PCOS debería ser tratado durante el embarazo con el fin de evitar el exceso de andrógenos. Otras teorías también sugieren que la exposición prenatal a un exceso de andrógenos podía deberse a la hipertrofia de la corteza de las glándulas suprarrenales en el feto (175,176,192).

Origen genético

Se postulan diferentes hipótesis sobre el origen genético del PCOS. Uno de los primeros en estudiarse fue la mutación en el gen INSR de la insulina, sin resultados concluyentes. Seguidamente, se investigó la existencia de una asociación del PCOS a un marcador de un tramo variable del gen (VNTR [del inglés, Variable Number of Tandem Repeats]) de la insulina, que modula su expresión. Este fragmento VNTR, presenta dos alelos, el I y el III, estando asociado el número III (genotipo homocigoto III/III) con IR, obesidad central, PCOS y TD2 (193,198). En cuanto a la IR, también se han estudiado genes que regulan la secreción y la acción de la insulina (IGF1 y su receptor IGF1R [del inglés, Insuline Growth Factor Receptor], IGFBP1-3 [del inglés, IGF Binding Protein 1 to 3], genes INS [del inglés, Insulin], INSL [del inglés, Insulin Similar], IRS1/2 [del inglés, Insulin Receptor Substrates]).

Otros de los genes implicados, son los genes codificadores de receptores de la proliferación de los peroxisomas gamma (PPAR γ [del inglés, Peroxisome Proliferator Activated Receptors gamma]), que pueden estar relacionados tanto con la IR, como con el hiperandrogenismo. Se han investigado varios genes implicados en la biosíntesis y el metabolismo de las hormonas esteroides, como los codificadores de la enzima reguladora de esteroidogénesis (StAR [del inglés, Steroidogenic Acute Regulatory Protein]), el citocromo P450 (CYP [del inglés, Cytochrome P] familia 11, 17 y 19 (CYP11, CYP17, CYP 19); genes codificadores de I(HSD17 [del inglés, Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase]) como el HSD17B1-3 y HSD3B1-2, genes que reguladores de la acción de las gonadotropinas y las hormonas gonadales (ACTR [del inglés, Activating Receptor] ACTR1, ACTR2A-B, INHA [Inhibin Alfa Subunit], LHCGR [del inglés, Luteinizing Hormone Choriogonadotropin Receptor], FSHR [del inglés, Follicle Stimulating Hormone Receptor]), la obesidad y regulación energética (MC4R [del inglés,

Melanocortin 4 Redeptor], OB [del inglés, Obesity gen product-leptin], OBR [del inglés, Leptin Receptor]) (188,193,198), entre otros. El papel de la expresión de ciertos genes continúa estudiándose, debido a la coexistencia de diferentes mecanismos fisiopatológicos. Por ello, no es posible afirmar una única causa genética a día de hoy.

Como hemos podido observar, se trata de una enfermedad de etiología multifactorial que tienen en cuenta la convergencia de diferentes alteraciones en las pacientes, como son las alteraciones metabólicas, la función ovárica, la genética, la esteroidogénesis, las alteraciones en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, y los factores ambientales (entre los que destacan la dieta, el sedentarismo, y el estrés por su implicación con la elevación de los niveles de cortisol) (30,188,194,196). Será necesario considerar el diagnóstico de cada paciente de forma multidisciplinar, integrando la comunicación de diferentes profesionales para evaluar las posibles vías fisiopatológicas implicadas en cada caso y abordar un correcto diagnóstico, manejo y tratamiento del paciente (figura 10).

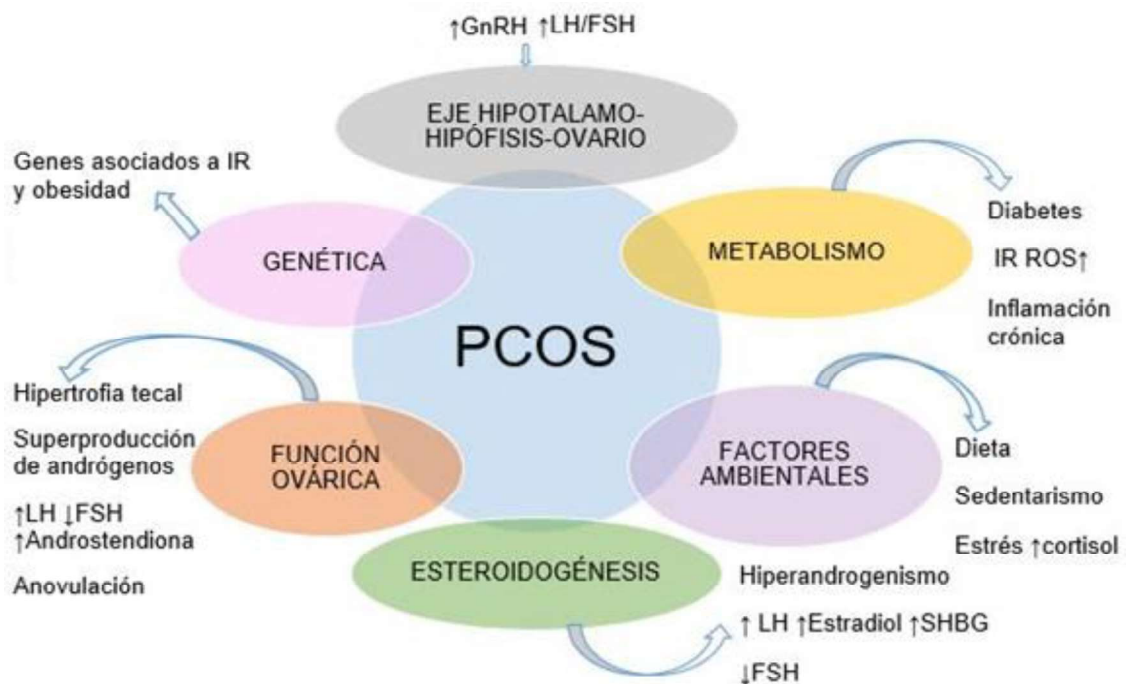


Figura 10. Resumen de las bases patológicas, fisiopatología y principales alteraciones hormonales en PCOS. FSH: hormona folículoestimulante; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; IR: resistencia a la insulina; LH: hormona luteinizante; ROS: especies reactivas de oxígeno; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales. Fuente: elaboración propia.

Manifestaciones clínicas

Las manifestaciones clínicas en este síndrome, son muy variadas dado que se presentan de diferentes formas según el fenotipo. Además, influye la edad del paciente y el consiguiente estado de desarrollo, estado hormonal y metabólico. Siendo más evidentes las manifestaciones clínicas en mujeres jóvenes en edad reproductiva y con un diagnóstico reciente. Aparte de las manifestaciones clínicas y/o bioquímicas necesarias para su diagnóstico (anteriormente desarrolladas), destacan por su elevada prevalencia la obesidad, el hirsutismo, la alopecia, el acné, la inflamación crónica de bajo grado, el estrés oxidativo, la disfunción endotelial, la aterosclerosis y la enfermedad CV.

Obesidad

El sobrepeso y la obesidad (38% -88%) son frecuentes en el PCOS, y conllevan manifestaciones bioquímicas como la alteración del perfil lipídico y la IR, en consecuencia (199). Existen estudios que muestran como la pérdida de peso moderada (alrededor de un 5%) en las pacientes PCOS, ayuda a regular el ciclo menstrual, y mejora las condiciones reproductivas, hiperandrogénicas y metabólicas (186,187,199,200)

La obesidad genera una alteración del perfil lipídico, produciendo un aumento de los triglicéridos y las partículas de LDL pequeñas y densas y así como un descenso de las lipoproteínas de alta densidad (HDLc [del inglés, High Density Lipoprotein cholesterol]) que contribuyen a la IR. La hiperinsulinemia compensatoria estimula la producción ovárica de andrógenos y produce disfunción ovárica. La lipólisis mediada por los andrógenos influye en la alteración del metabolismo energético, produciéndose una disfunción metabólica, tanto en la obesidad como en el PCOS. El aumento de peso -sobrepeso y obesidad-, la dificultad para quedarse embarazada y las irregularidades en el ciclo menstrual suelen ser frecuentes en las PCOS con IR (199).

Asociada a la obesidad y a la IR, puede existir acantosis nigricans (hiperpigmentación e hiperqueratinización cutánea de los pliegues de la piel) en axilas, ingles y cuello de forma bilateral; siendo la causa principal más aceptada, la estimulación de los queratinocitos y fibroblastos por el aumento de la IGFS

libre y por la propia estimulación de la insulina sobre los receptores BPS (167,175,177).

Hiperplasia del endometrio e irregularidades en el ciclo menstrual

Las alteraciones el ciclo menstrual suelen ser unos de los primeros signos que hacen que la paciente acuda al ginecólogo y se comiencen a realizar pruebas diagnósticas para confirmar la presencia del PCOS. Suelen presentar alteraciones en el ciclo, pudiendo existir la anovulación u oligoovulación (ovulación escasa) y como consecuencia a ello puede haber infertilidad (187).

La producción sostenida de estrógeno por los ovarios sin el efecto contrarrestante de la progesterona puede generar, además de las menstruaciones irregulares, el aumento del riesgo de hiperplasia del endometrio (167).

Hirsutismo, alopecia y acné

La alteración en la secreción de andrógenos, ocasiona en las pacientes hiperandrogenismo que puede ser clínico y/o bioquímico. En los casos en los que se aprecia hiperandrogenismo clínico, se observa hirsutismo (crecimiento de vello facial y corporal en exceso) y, paralelamente, puede haber caída de cabello (alopecia androgénica). La presencia de acné inflamatorio, comedogénico o ambos y la dermatosis, es común durante la pubertad y los cambios hormonales en las diferentes etapas de la vida. Una de las causas más comunes del acné en pacientes PCOS, es la seborrea secundaria al hiperandrogenismo (167). Aunque el hirsutismo y el acné suelen ser frecuentes, la tendencia actual de eliminación del vello corporal con técnicas definitivas como el láser, junto con la toma de OC, ha reducido la prevalencia de estas manifestaciones clínica en las pacientes. Muchas veces estos cambios visibles clínicamente, junto con la facilidad que presentan estas pacientes en los cambios de peso, llegan a generar una vulnerabilidad ante trastornos psicológicos (sobre todo de tipo ansioso-depresivo) (201). Estos cambios emocionales pueden afectar de forma negativa, empeorando las patologías dérmicas, debido al aumento del estrés de forma mantenida (sobre todo la dermatosis y los episodios de acné) (201).

Inflamación crónica de bajo grado, estrés oxidativo y riesgo CV

Una de las causas que explican la inflamación crónica de bajo grado presente en el PCOS, es la alteración del metabolismo lipídico (202,203). La grasa visceral es metabólicamente más activa que la subcutánea y libera mediadores inflamatorios como las adipoquinas que actúan como citoquinas, participando activamente en la fisiopatología de la RI, la obesidad, la TD2 y las enfermedades CV (202). Como es de esperar, la inflamación asociada a la alteración del metabolismo lipídico, es mayor en las pacientes PCOS obesas, si se compara con las pacientes con normopeso (1,175,197,202). Las adipoquinas leptina y adiponectina son mediadoras del metabolismo de la glucosa. La adiponectina a niveles fisiológicos regula funciones como: expresión de genes de la ciclooxigenasa-2 (COX-2), PGE (del inglés, Prostaglandin E) sintasa y VEGF asociado con la remodelación preovulatoria del folículo ovárico. También disminuye la secreción de LH y aumenta la secreción de progesterona y estradiol por medio de un aumento de la actividad del CYP450 aromatasa (202).

La leptina participa en la regulación de la ingestión a largo plazo, el peso corporal, el gasto energético y las funciones neuroendocrinas. El hecho de que la leptina se encuentre sobreexpresada en el tejido adiposo de la mayoría de los obesos, ha llevado al desarrollo del concepto de la resistencia a la leptina. A nivel fisiológico, la leptina induce un efecto sensibilizador de insulina, al promover la oxidación de ácidos grasos libres y la reducción de la acumulación de grasa. De la misma forma, se ha demostrado que los pulsos de leptina son sincronos con los de LH y estradiol en mujeres con normopeso y que la obesidad puede evitar estos pulsos (31). En el PCOS, la adiponectina y la leptina se encuentran reducidas, y son inversamente proporcionales a los niveles de hiperandrogenemia (de origen ovárico o suprarrenal) que se ha visto que favorece la deposición de dicha grasa visceral (202). La interacción entre la RI, la obesidad, y la hiperandrogenemia, presente en el PCOS aumenta la adiposidad visceral (202) que desencadena la liberación de citoquinas proinflamatorias (tales como: TNF α , IL6, la adiponectina y la leptina, entre otros (177)) produciendo un mayor riesgo de disfunción endotelial y enfermedades CV (166,204).

Las alteraciones metabólicas – hiperandrogenismo, dislipidemia y obesidad – relacionadas con el PCOS pueden aumentar los niveles de MDA (producto final de la peroxidación lipídica) y la producción de ROS (89), induciendo un estado de estrés oxidativo que se ha asociado con el desarrollo de la IR (28,89,203). Además, la hiperinsulinemia altera la secreción de óxido nítrico (NO) por parte del endotelio vascular, generándose como resultado una disminución en la fluidez de la membrana celular, que conduce a un aumento en los niveles de calcio intracelular y favorece la disfunción endotelial y el desarrollo de cardiopatía aterosclerótica (89,91,105,138,159).

Entre los factores de riesgo de aterosclerosis y enfermedad CV, encontramos la obesidad, la dislipidemia, el estrés oxidativo, la disfunción endotelial y la TD2. Dichos factores, son frecuentes en pacientes con PCOS (165,195,205). Además, la IR, el estrés oxidativo y disfunción endotelial, sumada a un estado inflamatorio sistémico de bajo grado, son riesgos adicionales que pueden contribuir a la aparición de patología CV (89,202,203,206,207). La obesidad y la RI, se asocian a un estado protrombótico con sustancias proinflamatorias elevadas como la CRP, fibrinógeno, leucocitos, inhibidor principal del activador tisular de fibrinógeno 1 (PAI1) y la endotelina 1 (ET1). Dicha elevación de sustancias protrombóticas, favorece la disfunción endotelial, reduce la actividad vascular, y promueve la aterosclerosis subclínica (202,206,207)

La hiperinsulinemia aumenta la síntesis de PAI1, inactivándose el plasminógeno tisular y la urocinasa, por lo cual, la fibrinólisis se ve incrementada. Todo ello conduce a que exista una pérdida del equilibrio coagulación/fibrinólisis, incluyendo la hiperactividad plaquetaria, y un estado protrombótico (202,206,207). Dada la variabilidad del fenotipo de PCOS, una de las premisas para conocer el riesgo CV en las pacientes es medir los niveles de colesterol total, triglicéridos, HDLc y LDLc, así como el tamaño o grado de oxidación de estas últimas de forma que nos permita evaluar su perfil lipídico (166). La alteración de dichos marcadores puede producirse en presencia o ausencia de obesidad, pero se ven agravados en las pacientes obesas (207).

Tratamiento y manejo del PCOS

El tratamiento de las pacientes, dependerá de cuáles sean las manifestaciones clínicas y bioquímicas que presente y la gravedad de estas. Se debe de realizar un planteamiento individualizado, ya que al existir una gran variabilidad de expresión de los diferentes fenotipos no existe un único protocolo de intervención. Todos los tratamientos van encaminados a conseguir y mantener un equilibrio endocrino-metabólico y el control de las manifestaciones clínicas. Se debe realizar un tratamiento dinámico, dado que dichas manifestaciones pueden ir cambiando en el tiempo por factores como la edad y sus diferentes etapas hormonales (pubertad, periodo fértil, y menopausia), los cambios en el BMI, las interacciones de los diferentes tratamientos pautados y la presencia de comorbilidad como por ejemplo la TD2.

Las últimas guías para el tratamiento del PCOS (93,194,208–212) contemplan intervenciones sobre estilo de vida, toma de diferentes fármacos, el tratamiento cosmético-dermatológico y el abordaje quirúrgico en los casos que contemplen una mayor gravedad.

Intervenciones sobre el estilo de vida

Estas intervenciones forman parte de las últimas guías elaboradas por el Consorcio Internacional para la puesta al día sobre la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento del PCOS. Este consorcio fue representativo a nivel mundial, dado que contempló amplias zonas geográficas, con numerosos países, formando parte de él España (Departamento de Endocrinología del Hospital Sant Joan de Deu, Barcelona; Departamento de Endocrinología Pediátrica del Hospital de Girona Dr. Josep Trueta, El Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba "IMIBIC", y el Centro de Investigaciones Biomédicas en Red Diabetes y Enfermedades Metabólicas "CIBERDEM" Instituto Carlos III, Madrid), Italia, Alemania, Bélgica, países del Reino Unido, Turquía, India, Emiratos Árabes Unidos, Estados Unidos, Australia, Bahréin, Botsuana, Egipto y Japón (194).

Control nutricional

Se deben recomendar dietas encaminadas a prevenir la hiperglucemia, la IR, y el sobrepeso, con alimentos con bajo índice glucémico, hidratos de carbono de

absorción lenta (pasta, harina y arroces integrales) y frutas y verduras variadas (194,208). También se recomienda el consumo de suplementos nutricionales del complejo vitamínico del grupo B, como es el inositol. Su ingesta se ha relacionado con la reducción de BMI, la mejora del perfil androgénico y la madurez ovocitaria en pacientes con PCOS (se encuentra en legumbres, nueces, trigo sarraceno y los cítricos) (208). Otro de los suplementos nutricionales empleados es el resveratrol (un flavonoide presente en plantas como las uvas rojas y los frutos rojos) con propiedades antiinflamatorias y antioxidantes. Este flavonoide se ha relacionado con la mejora de la IR, la reducción de andrógenos, del colesterol y del tejido adiposo en PCOS (209). Por otro lado, también es frecuente encontrar un déficit de vitamina D en PCOS, sobre todo en aquellas con IR, siendo beneficioso su consumo para el metabolismo óseo, la correcta maduración folicular y el equilibrio entre los niveles de progesterona y estrógenos (210).

Actividades física y deportiva

El sedentarismo se relaciona con algunas de las manifestaciones clínicas del PCOS, como es la obesidad, el riesgo de enfermedades CV, el desarrollo de TD2 e IR. Por ello, la actividad física regular, puede ayudar al manejo de estas manifestaciones. Se sabe que la práctica de actividades aeróbicas ayuda a reducir el BMI y la grasa abdominal y en consecuencia, a disminuir el riesgo de enfermedades CV. El entrenamiento físico de intensidad moderada, practicado regularmente, se relaciona con la mejora de la función endotelial en PCOS, evidenciándose por medio de la reducción de la MMP9 (implicada en el remodelado vascular, la aterosclerosis y la disfunción ovárica) (93,194,213). También se ha estudiado la influencia del ejercicio moderado en la disminución de la tensión arterial, los índices antropométricos y la reducción de la IR, observándose una mejoría en pacientes controles y PCOS (213).

Durante el ejercicio aeróbico, las adaptaciones bioquímicas desencadenan una serie de estímulos fisiológicos que aumentan el consumo de oxígeno y la oxidación de ácidos grasos libres y estimulan la circulación de la glucosa como fuente de energía. De esta forma, el metabolismo aeróbico aumenta para suministrar la energía requerida por la actividad muscular, reduciendo el volumen de grasa corporal y aumentando la actividad cardiometabólica (211). Dado que

el deporte ayuda a reducir los niveles de insulina, podría ser beneficioso sobre el control de los mecanismos de retroalimentación positiva que ejerce la insulina sobre los receptores IGF y de esta forma contribuir a la regulación del ciclo menstrual y la mejora de las alteraciones hormonales (sobre todo a la hiperandrogenemia y la hiperinsulinemia) (211,213).

Tratamiento farmacológico

El tratamiento farmacológico se centra principalmente en 3 grandes vías terapéuticas y la posible combinación de ellas: la toma de OC, sensibilizadores de la insulina y antiandrogénicos.

OC

Dentro de los OC, encontramos los combinados (estrógeno y progestágeno) o los que llevan solo un progestágeno. Los más empleados son los OC combinados, dado que han demostrado buenos resultados sobre la regulación del ciclo menstrual, la mejora del hirsutismo, la alopecia androgénica y el acné. Por ello, forman parte de las recomendaciones de tratamiento del PCOS sobre todo en pacientes adolescentes (194,214). Sus efectos se consiguen por la inhibición que causan a nivel ovárico en la secreción de andrógenos y la elevación de la SHGB hepática y su consiguiente reducción de los andrógenos libres. Los efectos secundarios más frecuentes son: cefalea, dolor en glándulas mamarias, incremento del riesgo de tromboembolismo, alteración del perfil lipídico y tendencia a aumentar la IR.

Existen otras vías de administración de anticonceptivos hormonales como son los parches dérmicos, las inyecciones, los implantes subdérmicos de liberación lenta, el anillo transvaginal y también la liberación de progestina por medio del dispositivo intrauterino, aunque la primera línea de tratamiento actual sigue siendo las intervenciones sobre el estilo de vida y la toma de OC (194,212).

Sensibilizadores de la insulina

Existen dos clases de agentes sensibilizadores de la acción de la insulina: las biguanidas (metformina) y las glitazonas (pioglitazona).

La metformina es un agente oral antihiper glucemiante y es usada ampliamente para el tratamiento de la intolerancia a la glucosa y la TD2. Disminuye la

concentración de glucosa plasmática sin aumentar la secreción de insulina. Dentro de los mecanismos de acción encontramos el aumento de la activación de los transportadores de glucosa, y su consecuente captación y metabolismo en las células hepáticas y musculares y la inhibición de la gluconeogénesis y glucogenolisis estimulada por glucagón. Se produce de esta forma una activación de la vía de proteína quinasa activada por adenosín monofosfato (AMPK) a nivel hepático y muscular, iniciándose un proceso catabólico de fosforilación de proteínas y grasas, para reponer el adenosín trifosfato (ATP) y asegurar la disponibilidad de energía. A nivel ovárico disminuye la producción de andrógenos a través de la inhibición de la StAR y la expresión de la 17 α -hidroxilasa (enzima del CYP450 que participa en la esteroidogénesis) (215).

Por otro lado, al disminuir la disponibilidad de IGF1 en las células granulosas, favorece un descenso en la concentración intrafolicular de andrógenos y a través de la activación de la vía AMPK en el hipotálamo, contribuye a la regulación de la secreción de LH (194,215).

Los efectos secundarios más comunes son las molestias gastrointestinales, y la acidosis por ácido láctico, sobre todo en pacientes con TD2 o patologías renales.

La pioglitazona también se ha empleado en las pacientes con PCOS e IR. La pioglitazona es un agonista potente y selectivo de los PPAR γ activados con efectos similares a la metformina, pero en este caso, es posible que exista edema y un aumento de peso como efectos secundarios. Aunque existen estudios que muestran mejores resultados con el uso de pioglitazona comparado con metformina en PCOS (216), el efecto secundario de la tendencia al aumento de peso y edema limitan su uso (212,215,216). Tanto la metformina como la pioglitazona, forman parte de una segunda vía de tratamiento en el tratamiento del PCOS, además pueden usarse asociado a la toma de OC (194,212,215).

Antiandrogénicos

Este grupo de fármacos es empleado en las pacientes PCOS con hiperandrogenismo e hiperandrogenemia que no ha podido ser controlada con tratamientos de primera elección como los OC. Entre los más conocidos

encontramos la espironalocetona, la finasterida y el acetato de ciproterona (172,194,206).

La espironalocetona (antagonista periférico de aldosterona) actúa principalmente mediante un mecanismo competitivo de unión a los receptores de la zona de intercambio Na^+/K^+ dependiente de aldosterona localizados en el túbulo contorneado distal. El efecto antiandrogénico se le atribuye por ser un antagonista periférico de los andrógenos. Aunque consigue la reducción del hiperandrogenismo y la hiperandrogenemia, presenta como efecto secundario frecuente las irregularidades del ciclo menstrual, generando hemorragias, náuseas, cefaleas, la hipotensión arterial y disminución de la libido (194,212).

La finasterida es un inhibidor competitivo de la enzima 5α -reductasa de tipo II que transforma la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), su molécula activa, sin aumentar la secreción de LH ni FSH, reduciendo los niveles de DHT en plasma. Entre los efectos secundarios encontramos el aumento de las enzimas hepáticas y disfunción hepática (en efectos poco frecuentes y a largo plazo).

El citrato de ciproterona es un agonista débil de los receptores de andrógenos que bloquea directamente los andrógenos endógenos tales como la testosterona y DHT de la unión y activación de los receptores de andrógenos. Este fármaco puede encontrarse como único principio activo del medicamento (Adrocur) o de forma combinada con etinilestradiol, en forma de OC (Diane). Los efectos secundarios más frecuentes cuando se emplea como único principio activo, son la hepatotoxicidad, náuseas, sangrado irregular durante el ciclo menstrual, y la disminución de la libido. Sin embargo, el uso en pequeñas dosis, junto con etinilestradiol, consigue buenos resultados sobre la regulación del ciclo menstrual, el hiperandrogenismo y la hiperandrogenemia (217).

Tratamiento cosmético-dermatológico

La remoción del exceso de vello corporal en pacientes con hiperandrogenismo, suele ser muy demandado por las pacientes. Una de las técnicas que presenta mejores resultados es la eliminación del vello con láser. Estos tratamientos pueden ir asociados a las intervenciones con fármacos (en cremas o vía oral)

para reducir el hiperandrogenismo y sus consecuentes manifestaciones, entre ellas el hirsutismo.

El acné y la dermatosis también suelen obtener buenos resultados tras el tratamiento local. Se emplean fármacos para conseguir el control de la seborrea y la piel grasa y se recomienda evitar cualquier producto que sea comedogénico. El tratamiento dermatológico con menos efectos secundarios es el uso de retinoides tópicos y los antibióticos tópicos. Además, los retinoides por vía oral y los antibióticos por vía oral también pueden ser empleados, pero en este caso presentan mayores efectos secundarios (176,194,212).

Intervención quirúrgica

Pueden realizarse tratamientos quirúrgicos destinados a la remoción de los quistes o a mejorar la fertilidad por modificación del ovario, y en los casos más graves la extirpación completa del ovario. Normalmente, estas opciones son llevadas a cabo tras el fracaso de los tratamientos farmacológicos y de las demás intervenciones médicas mencionadas. Dentro de las técnicas más frecuentemente empleadas, encontramos la exéresis de quistes de gran tamaño, la resección cuneiforme (resección de parte de la corteza ovárica) y el “drilling” ovárico (múltiples perforaciones pequeñas con electrobisturí en tratamientos de fertilidad) que suelen realizarse con laparoscopia. Aunque se ha demostrado obtener buenos resultados con las técnicas quirúrgicas (218), la aparición de adherencias, y otras secuelas tras la cirugía, hace que no formen parte de la primera línea de tratamiento del PCOS (167,176,194,215).

Síndrome de ovario poliquístico y enfermedad periodontal

Recientemente, se ha planteado una asociación convergente entre PDs y PCOS. La estimulación y secreción crónica de citoquinas proinflamatorias asociada con la infección periodontal contribuyen a la IR presente tanto en la periodontitis como en el PCOS, lo que podría explicar la existencia de una posible asociación entre ambas enfermedades (54). Además, parece ser que el PCOS se asocia a un aumento de estrés oxidativo (219) y de inflamación sistémica, observándose en mujeres con PCOS un aumento de ROS, marcadores de peroxidación lipídica, de niveles de CRP, citoquinas inflamatorias, del porcentaje de linfocitos y monocitos sanguíneos y el descenso de defensas antioxidantes (36). Como hemos mencionado previamente, la TD2 y la obesidad también se han relacionado con un aumento de la prevalencia y severidad de periodontitis (28,53,104,146,220), siendo ambas patologías comorbilidades frecuentes del PCOS (52,195,216) (figura 11). Por otro lado, las alteraciones hormonales que se presentan en el PCOS, principalmente el aumento de estrógenos y andrógenos, puede alterar la flora microbiana subgingival, y la capacidad de defensa presente en el epitelio gingival, modificando su permeabilidad (30).

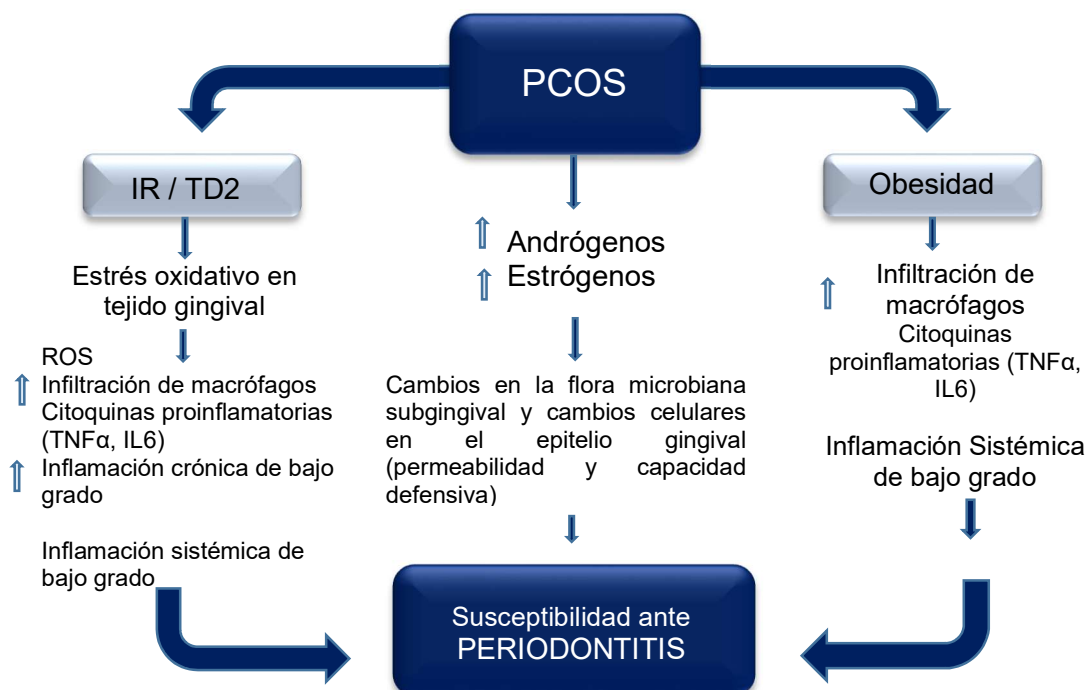


Figura 11. Mecanismos patogénicos que vinculan el PCOS y la periodontitis. IL6: interleuquina 6; IR: resistencia a la insulina; ROS: especies reactivas de oxígeno; TD2: diabetes mellitus tipo 2. Fuente: adaptado de Tanguturi SC *et al.*, 2018 (30).

Dentro de las hormonas más estudiadas, por su implicación en los diferentes estados hormonales de la mujer (pubertad, ciclo menstrual, embarazo y menopausia), encontramos el estrógeno y la progesterona (221). Ambas son hormonas sexuales femeninas esteroideas, secretadas a nivel ovárico y suprarrenal. El estrógeno es crucial para el desarrollo y para la homeostasis, pudiéndose encontrar dependiendo de su estructura molecular, en forma de estradiol (dos grupos hidroxilo), estrona (un grupo hidroxilo) y estriol (tres grupos hidroxilos). El estradiol es la forma más potente y abundante durante los años reproductivos, y la más utilizada para los estudios *in vitro* e *in vivo* (19,221,222). Los niveles de estradiol fluctúan desde 5 pg/ml en la fase folicular temprana hasta un pico de 200-500 pg/ml justo antes de la ovulación en mujeres en edad fértil. En el PCOS, los niveles de estradiol pueden ser muy variables, viéndose aumentado sobre todo en las pacientes que presenten obesidad. Después de la menopausia, el nivel de estradiol desciende precipitadamente y permanece constante en torno a 3 pg/ml en las mujeres mayores de 60 años (222,223). Es una hormona que participa en diversas funciones importantes en los tejidos; provoca la disminución de la queratinización y aumento del glucógeno epitelial, teniendo como resultado, la reducción de la eficacia de la barrera epitelial. También estimula la fagocitosis de los PMNs e inhibe su quimiotaxis (224,225), reduce los linfocitos T mediadores de la inflamación, afectando a la inmunidad innata.

El estradiol se ha relacionado con la inflamación gingival, incluso en ausencia de acúmulos de placa bacteriana (224,225). Se ha estudiado su participación en el metabolismo del colágeno, siendo un elemento que estimula la formación de colágeno y la angiogénesis, siendo necesario en niveles normales para mantener una correcta vascularización de tejidos. Por ello, la bajada del estradiol en la menopausia, se ha relacionado con un detrimento de la capacidad regenerativa de los tejidos periodontales (225). Sin embargo, niveles altos de estradiol se han relacionado con un mayor sangrado gingival y con una mayor inflamación de los tejidos periodontales, como ocurre en las gingivitis hormonales en embarazadas (18), existiendo cierta controversia para establecer los efectos del estradiol sobre el periodonto.

La progesterona producida principalmente en los ovarios y en el cuerpo lúteo, se encarga de la promoción de la capacidad secretora del endometrio uterino, prepara el útero para la implantación del óvulo fecundado (en la segunda mitad del ciclo menstrual), y reduce la frecuencia e intensidad de las contracciones uterinas. La progesterona, a nivel tisular, genera un aumento de la dilatación vascular, con lo que aumenta la permeabilidad tanto en la circulación sistémica como a nivel periodontal (225). Se la relaciona con la regulación de la secreción de la prostaglandina E2 (PGE2) y la migración de los PMNs en el GCF. Además, la progesterona reduce el efecto antiinflamatorio de los glucocorticoides, e inhibe la síntesis de colágeno en los fibroblastos del ligamento periodontal, lo que conlleva una reducción del potencial de reparación de los tejidos periodontales (225). De la misma manera que ocurre con el estradiol, los niveles muy bajos de progesterona, se relacionan con un detrimento de la salud periodontal (tendencia a la pérdida de hueso y un aumento del CAL) (226), teniendo un papel beneficioso si se encuentra en valores fisiológicos normales.

Por lo tanto, es plausible que las fluctuaciones de estrógenos y progesterona presentes en el PCOS desempeñen un papel importante en la patogénesis y la propagación de las PDs (30,225).

Estudios transversales y longitudinales han demostrado la asociación entre la inflamación gingival y la variación de los niveles de estradiol, progesterona y testosterona séricos, relacionándose con ciertos cambios en la microbiota oral (sin acompañarse de un aumento placa bacteriana) (30,225,227). Concretamente, se encontró una mayor incidencia de *Bacteriodes* productoras de pigmento negro y otros bacilos Gram negativos en la microbiota subgingival, en comparación con pacientes que presentaron niveles menores de hormonas esteroideas (30,225,227). Tanto el estradiol como la progesterona, se acumulan selectivamente en la bacteria *Prevotella intermedia* (periodontopatógena) como sustituto de la vitamina K, por lo que, se postula que actúan como factor de crecimiento para este microorganismo. También se ha observado que las especies de *Capnocytophaga* aumentan tanto en número como en proporción en el medio subgingival durante la pubertad (etapa con un importante aumento de hormonas sexuales) y se ha demostrado que se correlacionan con una mayor tendencia al sangrado (225,227).

El hiperandrogenismo se ha relacionado con una susceptibilidad ante las PDs, por la modulación de ciertos factores inflamatorios implicados en la patogénesis de las PDs, como la inhibición de la secreción de prostaglandinas y la reducción de la producción de IL6 (30,225). Por otro lado, la estabilidad dentro de un rango de valores normales de los niveles de andrógenos, se ha relacionado con una mejora de la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, y de la síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos del ligamento periodontal (30,225).

Asimismo, el aumento de andrógenos provoca cambios perjudiciales, cualitativos y cuantitativos en la microbiota gingival (225–229). El aumento de especies de *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromona gingivalis* (patógenos periodontales ampliamente estudiados) se relaciona con niveles altos de andrógenos (225–229). Estos cambios en la microbiota se han asociado con el aumento del CAL y una mayor prevalencia de gingivitis y periodontitis. Estos hallazgos, nos muestran una posible vía de asociación entre el hiperandrogenismo presente en el PCOS y la mayor prevalencia de PDs (por el aumento de los periodontopatógenos) por el exceso de andrógenos (33,225–231).

Recientemente, se ha investigado como los niveles de hormonas esteroideas (andrógenos, estrógenos y progestinas) en pacientes con PCOS, influyen sobre la microbiota periodontal (231,232). Desde que, en 1982, Vittek *et al.*, (233) demostraron la presencia de receptores capaces de unirse específicamente al estradiol y moxestrol en el epitelio gingival masculino y femenino, diversos autores han orientado sus investigaciones hacia los posibles efectos que ejercen las hormonas esteroideas sobre los tejidos periodontales (225,226,228,229,232,234). La localización nuclear específica del estradiol se encontró predominantemente en las capas basales y espinosas del epitelio gingival, las células del tejido conjuntivo del estroma (fibroblastos), las células endoteliales y los pericitos de los capilares en la lámina propia (224,229,233,235). Estos resultados proporcionan la primera evidencia directa de que la encía humana puede funcionar como un órgano diana para los estrógenos, relacionándose con cambios en los tejidos periodontales modulados por estas hormonas (224,233,235).

Los cambios en la permeabilidad vascular y la capacidad defensiva del epitelio gingival, se ven influenciados por las hormonas sexuales, y al mismo tiempo este desequilibrio de la homeostasis influye sobre la microbiota gingival (30,228).

Aunque es sabido que ciertas bacterias periodontopatógenas (*Porphyromona gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, entre otras) se encuentran aumentadas en pacientes con gingivitis y periodontitis; este aumento es mayor en pacientes con PCOS (231), lo que se ha asociado con cambios en los niveles de estrógenos y andrógenos (30).

Existen muy pocos estudios publicados sobre la asociación entre PCOS y PDs. Özçaka *et al.* determinaron que el PCOS podría mediar la inflamación gingival a través de un aumento de la producción de la IL17, tanto en suero como en el GCF, de manera que los niveles de IL17 fueron más elevados en mujeres con PCOS y gingivitis, comparado con controles (16). Esta IL se sintetiza por los linfocitos T CD4 y se emplea como biomarcador en el inicio de la pérdida de inserción periodontal por su papel en el proceso de la reabsorción ósea en las PDs (236). La IL17 estimula a las células epiteliales, endoteliales y fibroblastos para producir IL6, IL8, PGE2. Es un importante inductor sobre los osteoblastos en la expresión del ligando de unión al receptor activador de NFκB (RANKL [del inglés, Receptor Activator of Nuclear factor Kappa-B Ligand]), estimulando la actividad osteoclástica y, en consecuencia, la reabsorción ósea. Se ha hipotetizado que el bloqueo de esta citoquina puede prevenir la destrucción ósea (236). Por ello, la IL17 se relaciona con la progresión de las PDs, sobre todo en bolsas periodontales que presenten sangrado al sondaje, como signo clínico de la actividad inflamatoria (16,236). Porwal *et al.* observaron que mujeres con PCOS presentaban mayores índices de inflamación gingival y de destrucción periodontal que mujeres sin dicho síndrome, estableciendo que las pacientes con PCOS podían tener una mayor prevalencia y probabilidad de desarrollar gingivitis y posteriormente periodontitis (54). Se encontró una media de PPD, BOP y CAL significativamente mayor en las PCOS, comparado con el grupo control (54).

Por otro lado, se demostró como el índice cintura-cadera (WHR [del inglés, Waist to Hip Ratio]) (medida antropométrica para evaluar el sobrepeso y la obesidad)

se asoció con la alteración de los parámetros periodontales. El aumento de dicho índice, se asoció con un nivel alto de CRP en suero e inflamación gingival. Al mismo tiempo, en las pacientes PCOS que recibían tratamiento médico y que reflejaban un control de los síntomas y signos del PCOS, se determinaron medias significativamente menores en los parámetros periodontales y en el WHR (54). Otros estudios han apoyado este hallazgo, encontrando en pacientes con PCOS una mejoría en los parámetros periodontales tras la estabilización de los signos y síntomas sistémicos del síndrome. Deepti *et al.*, en 2017 (237) estudiaron la influencia del SRP en el manejo de los signos y síntomas del PCOS, observando una reducción de la IR. Estos hallazgos, plantean una asociación bidireccional entre las PDs y el PCOS, de forma que un correcto manejo de las patologías periodontales podría influir en los signos y síntomas del PCOS y viceversa.

JUSTIFICACIÓN

JUSTIFICACIÓN

Las patologías que afectan al periodonto, al igual que ciertas enfermedades sistémicas, se encuentran asociadas a inflamación crónica de bajo grado, estrés oxidativo e IR. Esta inflamación puede desencadenar IR (238) y a su vez, la IR estimula la inflamación sistémica de bajo grado (55) generándose un mecanismo de retroalimentación positiva entre ambas.

Tanto la periodontitis (53,91,145,148,151,239) como el PCOS (93,166,204) se asocian a disfunción endotelial y, en consecuencia, a un mayor riesgo de enfermedades CV. Los mecanismos fisiopatológicos que vinculan el PCOS y las PDs no están del todo claro a día de hoy. Existen pocos estudios que reúnan la determinación de parámetros bioquímicos sistémicos (asociados a la patogénesis de las PDs), parámetros antropométricos, la historia clínica completa del paciente y realicen una exploración periodontal exhaustiva (que presente una exploración radiográfica y sondaje de todos los dientes).

Además, los nuevos criterios en la clasificación actual de las PDs, hace que los estudios anteriores a ella, no sean tan precisos como los que empleamos hoy en día para determinar el estado de salud periodontal. Actualmente, se requiere una revisión completa del estado de salud general del paciente, y se especifican ciertos parámetros bioquímicos que determinan la presencia de patologías sistémicas asociadas a las PDs que podrían ser desconocidas por el paciente.

Nuestro grupo de investigación ha llevado a cabo numerosos estudios para dilucidar los mecanismos fisiopatológicos que vinculan a las enfermedades sistémicas que presentan IR con las PDs y la disfunción endotelial (27,28,53,104,203,219).

Por lo tanto, considerando la asociación entre IR y periodontitis en pacientes obesos (28), nos planteamos desarrollar una nueva línea de investigación con el objetivo de establecer una posible asociación entre las PDs y el PCOS. En esta Tesis Doctoral, profundizamos en el estudio de los mecanismos moleculares subyacentes a la IR, así como la alteración del perfil inflamatorio y la disfunción endotelial y su posible asociación con el desarrollo de PDs.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Puesto que el PCOS, se asocia a RI (89) y a obesidad (169), y su asociación con las PDs ha sido constatada (28); estas pacientes podrían ser más vulnerables a desarrollar PDs. Así mismo, la presencia de PDs en PCOS podría relacionarse con la exacerbación de los niveles de inflamación sistémica y local, y la función endotelial, como ocurre en los pacientes obesos con periodontitis (203).

Por otro lado, las alteraciones bioquímicas y hormonales (como la alteración del perfil lipídico y la hiperandrogenemia) presentes en el PCOS, podrían estar relacionadas con el empeoramiento de los parámetros periodontales y la presencia de PDs (227,228).

Objetivo general

El objetivo general es confirmar la existencia de asociación entre PCOS y PDs y si es así, determinar si hay una mayor prevalencia y/o severidad de las PDs en pacientes con PCOS que en pacientes sin dicho síndrome.

Este objetivo general se va a concretar en los siguientes objetivos específicos:

1. Observar si las pacientes PCOS presentan peores parámetros clínicos periodontales que las pacientes sin dicho síndrome (grupo control).
2. Analizar los hábitos de higiene oral, hábito tabáquico y consumo de alcohol en ambos grupos y la influencia de los mismos sobre los parámetros periodontales.
3. Observar si los tratamientos farmacológicos recibidos para el manejo del PCOS se asocian a un peor estado periodontal.
4. Estudiar cómo influyen los parámetros antropométricos, bioquímicos y hormonas sexuales sobre los parámetros periodontales y sobre la prevalencia de PDs en las pacientes con PCOS comparado con las controles.
5. Analizar el perfil inflamatorio y activación del inflamasoma NLRP3 en células mononucleares de sangre periférica mediante Western blot y mediante cuantificación sistémica de citoquinas proinflamatorias en una subpoblación de pacientes ajustadas por BMI en las pacientes PCOS y controles según la presencia/ausencia de PDs.
6. Evaluar la función endotelial mediante las interacciones leucocito-endotelio y moléculas de adhesión celular solubles, en pacientes PCOS basándose en el estado periodontal comparado con controles.

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño del estudio

Se realizó un estudio observacional, con un diseño metodológico de casos y controles, en el Hospital Universitario Dr. Peset, en el Servicio de Odontoestomatología. El reclutamiento de los casos fue llevado a cabo con la colaboración del Servicio de Ginecología y el Servicio de Endocrinología y Nutrición por medio de una interconsulta, derivando a las pacientes PCOS que cumplían criterios de inclusión al Servicio de Odontoestomatología. El reclutamiento de las controles se llevó a cabo en el Servicio de Odontoestomatología, con las pacientes sanas que acudieron a revisiones dentales (principalmente para control de terceros molares) sin patologías médicas de interés. Se reclutaron 166 pacientes, desde abril del 2019 hasta febrero del 2022, siendo 21 pacientes los que abandonaron el estudio por presentar alguno de los criterios de exclusión (12 casos y 9 controles). En total se analizaron 145 pacientes, siendo 74 casos y 71 controles (figura 12).

Para el estudio del perfil inflamatorio y riesgo CV se analizó una subpoblación con las pacientes ajustadas por edad y BMI, para cumplir el principio de comparabilidad entre los subgrupos.

Criterios de inclusión: el grupo casos fueron mujeres en edad fértil, entre 18 y 45 años, que presentaron PCOS de acuerdo a lo establecido en los criterios diagnósticos de Róterdam (169), el PCOS se diagnostica con al menos 2 de 3 de los siguientes criterios: anovulación crónica, clínica y/o evidencias bioquímicas de hiperandrogenismo (índice de hirsutismo según Ferriman-Gallwey mayor a 5 y testosterona libre total mayor o igual a 0,5 ng/dl), y aparición ultrasonográfica de ovario poliquístico.

En el grupo control se incluyeron mujeres del mismo rango de edad que hubieran tenido una revisión ginecológica y/o endocrina de los últimos 6 meses en la que se descartara cualquier signo o síntoma que pudiera dar lugar a la presencia de PCOS.

Criterios de exclusión: Por la propia naturaleza del estudio, se excluyeron todas aquellas pacientes con enfermedades que pueden alterar los parámetros estudiados, tales como: enfermedades inflamatorias, infecciosas, hematológicas, orgánicas o graves; historial de enfermedad CV (tromboembolismo, infarto o isquemia coronaria), hipertensión grave o causas secundarias de obesidad (hipotiroidismo, síndrome de Cushing), diabetes, hepatopatías, enfermedades musculo esqueléticas, disfunción pulmonar y síndrome de apnea e hipopnea del sueño. La administración de antibióticos sistémicos, durante los últimos 6 meses fue motivo de exclusión debido a las modificaciones que pueden ocurrir en la flora bacteriana oral. También se tuvo en cuenta la administración oral de antiinflamatorios de forma crónica (la toma puntual de antiinflamatorios fue aceptada, dejando un tiempo de 30 días sin desde la última prescripción antes de iniciar el estudio). El embarazo o la ausencia de menstruación de más de 3 meses, fue otro motivo de exclusión por la dificultad de comparar las variaciones hormonales entre las pacientes, dado que la evaluación de las pacientes se realizó entre el 1º y 5º día de menstruación. La toma de medicación antirresortiva, medicamentos que actúe sobre el metabolismo óseo o sobre el sistema inmunológico de manera crónica, fue motivo de exclusión. Por otro lado, la quimioterapia (en los últimos 6 meses) y haber recibido (en los últimos 6 meses) o estar en tratamiento de radioterapia de cabeza y cuello, así como otras enfermedades de tipo oncológico, fueron motivo de exclusión, dada su constatada influencia en las enfermedades bucales, así como la posible interacción entre los tratamientos recibidos y las variaciones periodontales. La medicación antiepiléptica, relacionada con el sobrecrecimiento gingival, se tuvo en cuenta como motivo de exclusión. La infección por el virus SARS-COV-2 (patógeno causante de la COVID19 [del inglés, Coronavirus Disease]) fue un motivo de exclusión por generar un estado inmunológico de infección aguda de las pacientes, el riesgo de contagio y por la posibilidad de presentar lesiones periodontales y/o bucales a causa de la infección viral.

Antes de iniciar el estudio, se les brindó la información relativa a los procedimientos a realizar durante la investigación a todas las participantes, por medio de la hoja de información al paciente, y se procedió a la firma del consentimiento informado y compromiso de confidencialidad (anexo 1). Este estudio se ajusta a las normas deontológicas establecidas sobre

experimentación humana de Helsinki y sus actualizaciones posteriores; además, cuenta con la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Doctor Peset (Referencia: CEIm: 31/19) (anexo 2). La información médica y todos los datos recogidos durante el estudio se mantendrán de forma confidencial de acuerdo con la actualización del 31/07/2018 de la Ley Orgánica 15/1999 sobre Protección de Datos Personales y el correspondiente Real Decreto 1720/07.

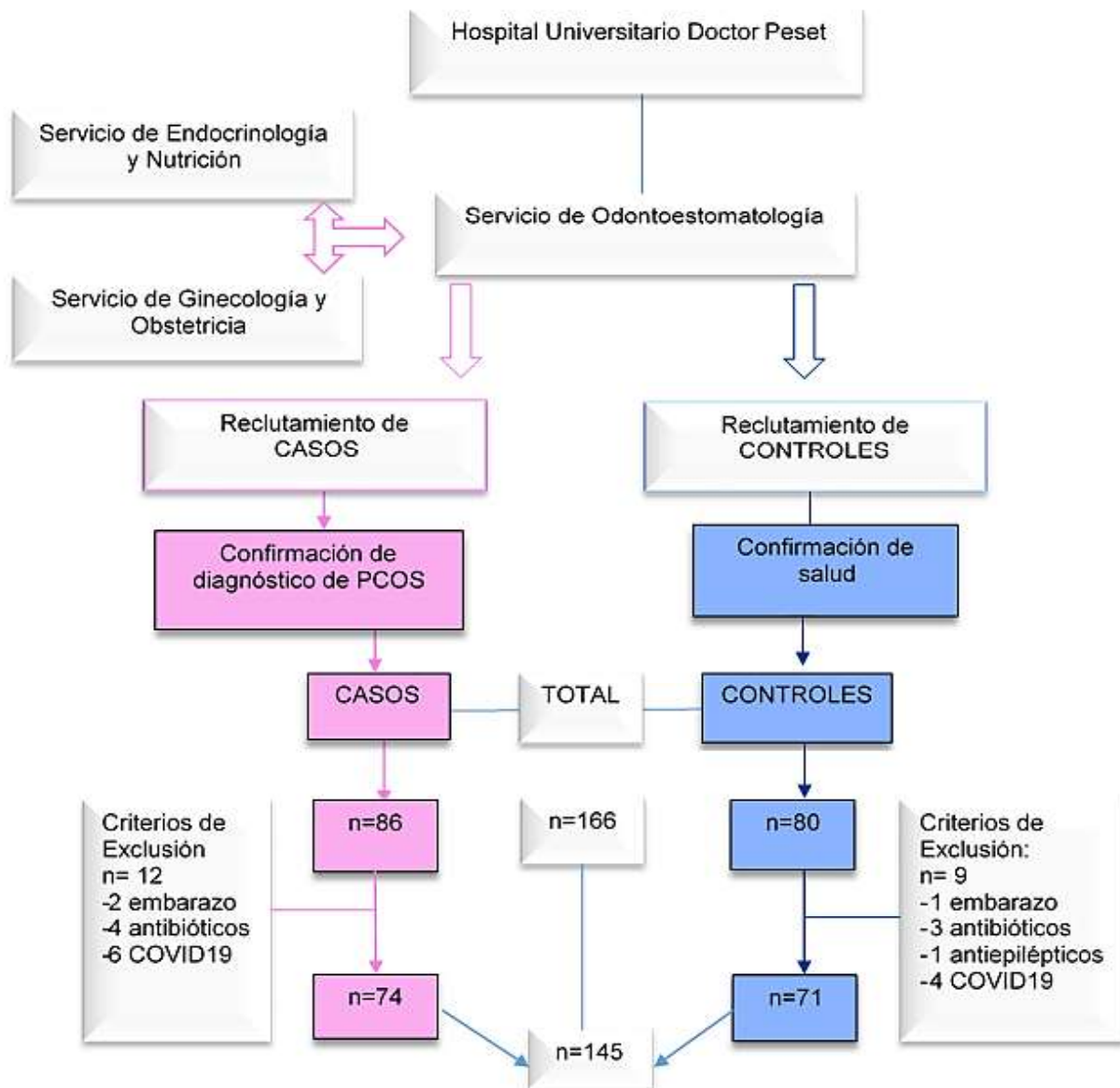


Figura 12. Diagrama del flujo llevado a cabo para el reclutamiento de las pacientes. Podemos observar cómo se implicó tanto el Servicio de Ginecología y Obstetricia como el Servicio de Endocrinología y nutrición para el diagnóstico de PCOS, realizando una interconsulta con el Servicio de Odontoestomatología para la inclusión en el estudio para el reclutamiento de los casos. COVID19: pacientes excluidos por infección por SARS-COV2.

En el Servicio de Odontoestomatología realizamos la exploración periodontal clínica y radiográfica (para la consecución del objetivo 1) y la historia clínica y anamnesis del paciente (para la consecución de los objetivos 2, 3 y 4). En el Servicio de Endocrinología y Nutrición se realizaron las extracciones de sangre y se tomaron las medidas antropométricas (para realizar las determinaciones del objetivo 5, 6 y 7). Los experimentos (del objetivo 6 y 7) fueron realizados en la Unidad de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo perteneciente a la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO).

Para llevar a cabo el objetivo 1: Se evaluó el estado periodontal de acuerdo a las determinaciones de los parámetros periodontales, recogidos en un periodontograma examinando la totalidad de los dientes presentes en boca (excepto los terceros molares y restos radiculares), midiendo 3 puntos vestibulares (mesial, medial y distal) y 3 puntos linguales/palatinos (mesial, medial y distal) (anexo 3).

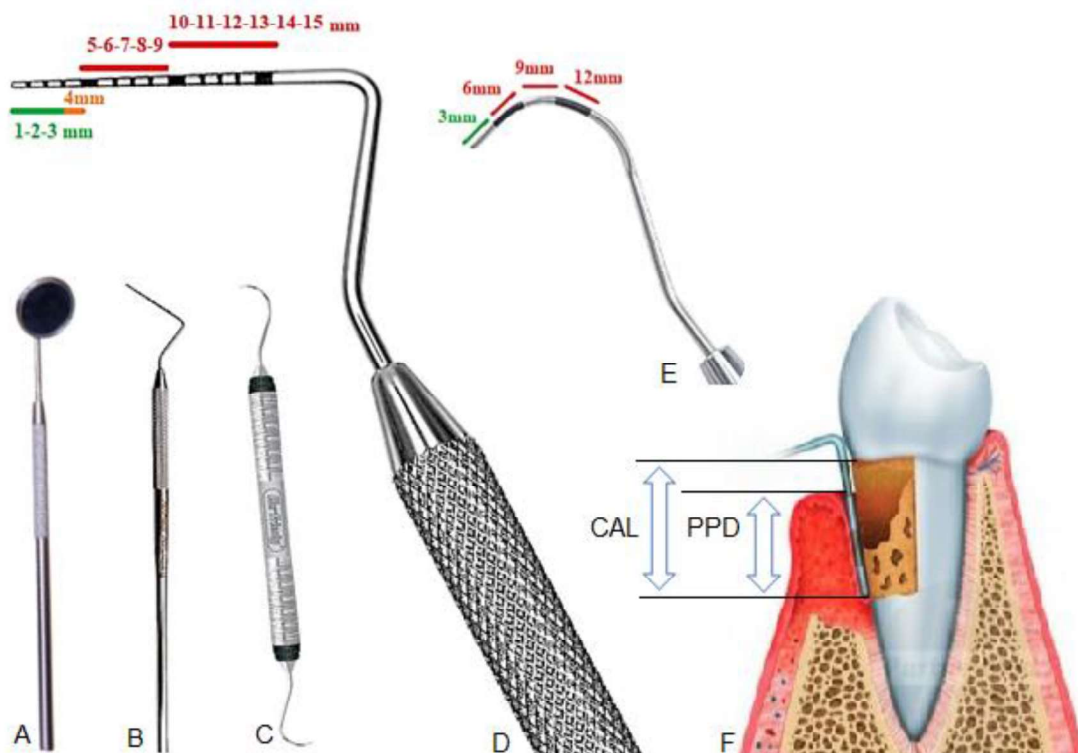
Parámetros periodontales evaluados:

- PPD en milímetros medida desde el margen gingival hasta el fondo del surco con la sonda periodontal North Carolina milimetrada (PCP UNC-15) (imagen 1).
- CAL en milímetros, pudiendo coincidir con PPD en los casos en los cuales el margen gingival coincide con la línea amelocementaria o siendo diferente en situaciones de recesión o pseudobolsas. En estos casos se calcula de la siguiente forma: CAL si hay recesión= PPD + recesión gingival y CAL cuando hay pseudobolsas= PPD - distancia del margen gingival a la línea amelocementaria. Se empleó la sonda PCP UNC-15.
- Movilidad dental: posicionando el mango de dos espejos, uno por vestibular y el otro por palatino/lingual, generando una suave presión en sentido vestíbulo-lingual, para ver si existe o no movimiento. Se determinó esta movilidad con el índice de Miller y Lindhe de 1950 pero, que actualmente sigue siendo el más empleado tanto clínicamente como en los estudios de investigación (240). Grado 0: no hay movilidad; grado I: leve movilidad horizontal menor a 1 mm en dirección vestibulolingual;

grado II: movilidad de más de 1 mm en dirección vestibulolingual; grado III: movilidad avanzada horizontal y vertical, en sentido apicocoronal. El grado de movilidad se representó con números romanos sobre la cara oclusal de cada diente en el periodontograma.

- Afectación de furcas: se llevó a cabo con la sonda de Nabers (imagen 1), midiendo la cantidad de penetración de la sonda en la furca, teniendo en cuenta el 100% del ancho de la raíz. El índice empleado fue el de Lindhe y Nyman de 1992, que continúa en uso actualmente (107). Grado I: La sonda ingresa en la furca menos de 1/3; grado II: la sonda ingresa en la furca más de 1/3; grado III: la sonda consigue pasar completamente, existiendo comunicación de un lado al otro.
- Índice de sangrado de Ainamo y Bay de 1975, en todos los dientes, calculándose el BOP. Se registraron los puntos de sangrado de las superficies mesial, distal, vestibular y palatino (4 puntos por diente) tras el sondaje, durante el primer minuto con la sonda PCP UNC-15. Se calculó de la siguiente forma: número de puntos sangrantes/ números de puntos sondados x100.
- Índice de placa de Silness y Løe de 1964: se llevó a cabo en los 6 dientes índice de Ramfjord (primer molar superior derecho, incisivo central superior izquierdo, primer premolar superior izquierdo, primer molar inferior izquierdo, incisivo central inferior derecho y primer premolar inferior derecho) por ser representativos de la higiene oral debido a su localización. Para el determinar el índice de placa, se revisaron las caras vestibulares, lingual/palatino, mesial y distal de cada uno de los dientes índice y posteriormente se anotó el grado de placa, para calcular la media. Los grados empleados son: 0: no hay placa; 1: No hay placa a simple vista, pero si la hay cuando se realiza el pasaje de la sonda por el área dentogingival (empleando la sonda de la Organización Mundial de la Salud, con punta redonda para evitar dañar el margen gingival); grado 2: hay placa bacteriana a simple vista; grado 3: hay placa bacteriana a simple vista rodeando el diente, incluso por espacios interdientales y puede haber cálculo. Posteriormente, se calcula la media: suma del grado de placa en los 6 dientes/nº de dientes explorados (en este caso 6).

- Índice de cálculo de Greene y Vermillion de 1964 en los dientes índice de Ramfjord: valor 0: no hay sarro presente; 1: cálculo supragingival que cubre no más de 1/3 de la superficie dental expuesta; 2: sarro supragingival que cubre más de 1/3 pero, menos de 2/3 de la superficie dental expuesta o hay presencia de vetas individuales de cálculo subgingival alrededor de la porción cervical del diente, o ambos; 3: sarro supragingival que cubre más de 2/3 de la superficie dental expuesta, o hay una banda gruesa continua de cálculo subgingival alrededor de la parte cervical del diente, o ambos. Este índice se determina con una exploración fundamentalmente visual, en caso de duda de cálculo subgingival, se debe de comprobar con la sonda periodontal. Se calcula la media: suma del grado de placa en los 6 dientes/nº de dientes explorados (en este caso 6) (107).



- Imagen 1. Espejo intraoral y sondas periodontales empleadas en la medición de los parámetros periodontales. A: espejo intraoral plano n°5, de 24 mm diámetro; B: sonda periodontal de la Universidad de Carolina del Norte, PCP UNC-15 Hu-Friedy® (para PS, PIC, BOP e índices de placa y cálculo), C: sonda de Nabers 2N MG 7 Hu-Friedy® (para exploración de furcas), D: detalle de la punta de la sonda PCP UNC-15; E: detalle de la punta de la sonda de Nabers; F: ilustración de las diferencias entre el CAL y la PPD.

- Pérdida ósea radiográfica: para unificar los criterios de valoración entre casos y controles, al grupo de casos se le realizó una ortopantomografía, ya que las pacientes del grupo control contaban con dicha exploración radiográfica para valorar la posición de terceros molares. Además, en las pacientes con periodontitis realizamos radiografías periapicales paralelizadas. Se midió la pérdida ósea teniendo en cuenta como 100% de hueso, la situación en la que coincide aproximadamente el tercio cervical del diente con el comienzo del hueso, siendo una situación ideal cuando el 100% de la longitud de la raíz está cubierta por hueso alveolar. Cuando el hueso comienza más de 3 mm por debajo de lo que sería la línea amelocementaria, se estima la pérdida de hueso, teniendo como referencia la cantidad de raíz que queda sin cobertura ósea (en porcentaje) y, en general, como es la pérdida teniendo en cuenta la totalidad de los dientes (realizando un promedio de los porcentajes).

Para el diagnóstico periodontal se emplearon los criterios salud periodontal, gingivitis y periodontitis de la CDC/AAP (CDC, del inglés “Centers for Disease Control and Prevention”; AAP del inglés, American Academy of Periodontology”) del workshop del grupo 1 (39) y grupo 2 (43), llevado a cabo en Chicago en 2017 y publicado en junio del 2018. Siguiendo estos criterios se determinó como caso de periodontitis cuando existen 2 o más sitios interproximales $CAL \geq 4$ mm (no en el mismo diente) o 2 o más sitios interproximales con $PPD \geq 5$ mm (no en el mismo diente) o dos o más 2 dientes que presenten en la vestibular o palatino $CAL \geq 3$ mm o $PPD > 3$ mm. Las periodontitis iniciales fueron aquellas que no cumplieron los criterios de periodontitis mencionados, pero que presentaron al menos 4 dientes con bolsas (desde 4 mm de PPD).

Para determinar la severidad de la periodontitis se tuvo en cuenta el valor de PPD, CAL, afectación de furcas, movilidad dental, defectos óseos, pérdida de hueso con respecto a la edad del paciente, proporción o desproporción entre higiene oral/severidad de afectación periodontal, número de ausencias dentales por causa periodontal (y el número de parejas de dientes en oclusión), trauma oclusal, frémito, colapso de la mordida, presencia de tabaquismo y número de

cigarrillos al día y la hemoglobina glicosilada. Con todas estas variables se determinó el diagnóstico de cada paciente por estadios y grado (tabla 4).

Según la extensión podrá ser clasificada como periodontitis localizada ($\leq 30\%$ de los dientes están afectados) o generalizada ($>30\%$ de los dientes están afectados)(43).

Las gingivitis y el concepto de salud periodontal, también fueron registradas, determinándose como gingivitis, la presencia de al menos un 10% de sangrado al sondaje; calculado con la variable $BOP \geq$ al 10%. Este concepto de diagnóstico, se estableció siguiendo el criterio del “Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions” (39). También se recogieron variables relativas al estado periodontal, como haber recibido tratamiento periodontal anterior o tartrectomía, la fecha de la última revisión bucodental, y la causa de pérdida de los dientes.

Para llevar a cabo el objetivo 2: Se registraron los hábitos de higiene oral (frecuencia de cepillado dental y uso de elementos de higiene interproximal), hábitos tóxicos (tabaco y alcohol [frecuencia y cantidad del consumo de ambas sustancias]), y fecha de la última visita al dentista, por medio de un cuestionario que rellenó la paciente mientras esperaba a ser atendida (anexo 4). Estos datos fueron analizados buscando las diferencias entre grupos (casos y controles) y en base a la presencia/ausencia de PDs.

Para llevar a cabo el objetivo 3: Por medio de la recogida de datos de la historia clínica de las pacientes se observó la medicación pautada, la dosis y el tiempo de administración de cada uno de los tratamientos farmacológicos recibidos. Los tratamientos habituales para el manejo del PCOS fueron los OC y la metformina. Por ello, ambos medicamentos no fueron motivo de exclusión de las pacientes y se analizaron en base a las diferencias entre los grupos (casos y controles) y en base a la presencia/ausencia de PDs.

Para llevar a cabo el objetivo 4: Se llevó a cabo la historia clínica y la anamnesis completa (anexo 4), teniendo en cuenta los antecedentes médicos y la presencia de patologías sistémicas que formaron parte de los criterios de exclusión

anteriormente mencionados. Se realizó una extracción de sangre venosa periférica, tras 12 horas de ayuno, coincidiendo con el período menstrual (desde el 1º al 5º día de sangrado). En esta misma cita se determinó la tensión arterial sistólica (SBP [del inglés, Systolic Blood Pressure]), tensión arterial diastólica (DBP [del inglés, Diastolic blood pressure]) y las variables antropométricas (peso (kg), talla (m), BMI: kg/talla en m²; contorno de la cintura (cm), contorno de la cadera (cm), índice cintura-talla (WSR [del inglés, Waist Stature Ratio]): cintura en cm/talla en cm y el índice WHR: cintura en cm/cadera en cm).

Para tener una referencia anatómica clara en las medidas antropométricas, se posicionó la cinta métrica al final de la caja torácica por encima del ombligo para medir el contorno de la cintura y a nivel de la cresta ilíaca (palpando el borde superior externo del hueso coxal) para medir el contorno de la cadera. Para la SBP y la DBP se empleó un tensiómetro automático (imagen 2), colocado en el pliegue del brazo izquierdo, realizando dos mediciones espaciadas por 5 minutos y realizando la media. La paciente estaba sentada, y llevaba al menos 30 min en reposo.



Imagen 2. Herramientas utilizadas para la antropometría. A: Tallímetro Seca® colocado de forma fija en la pared para medir la talla; B: báscula Seca® digital de columna modelo 727 (puesta en kg, con dos decimales); C: tensiómetro Omron® modelo m3 empleado para medir SBP y la DBP y D: cinta métrica para el perímetro de la cintura y de la cadera.

Determinaciones bioquímicas: para las determinaciones bioquímicas se extrajo sangre venosa periférica por venopunción. Se cuantificó la glucosa (mg/dL), insulina (μ UI/mL), hemoglobina glicosilada en porcentaje (A1c %), colesterol total (mg/dL), HDLc (mg/dL), LDLc (mg/dL) (LDLc [del inglés, Low Density Lipoprotein Cholesterol]) triglicéridos (mg/dL), hsCRP (mg/L), fibrinógeno (mg/dL),

complemento 3 (C3) (mg/dL), homocisteína plasmática ($\mu\text{mol/L}$) y proteína fijadora de retinol A (RBP4) (mg/dL) (anexo 5). Con los valores de glucemia e insulina basal mediante el método enzimático de la hexoquinasa y mediante enzimoquimioluminiscencia, respectivamente, se calculó el modelo homeostático de resistencia a la insulina (HOMA [del inglés, Homeostatic Model Assessment]) en base a la siguiente formula: $\text{HOMA} = \text{Insulinemia basal } (\mu\text{UI/mL}) \times \text{glucemia basal (mg/dL)} / 405$. Se determinó presencia de IR con un valor de HOMA ≥ 3 (241–243). Para descartar otras patologías sistémicas se valoró el hemograma completo y el perfil tiroideo sin haber diferencias entre las pacientes.

Perfil de hormonas sexuales: se cuantificó la FSH (mUI/dL), LH (mUI/dL), estradiol (pg/mL), testosterona total (ng/dL), androstendiona (ng/mL), dehidroepiandrosterona sulfato (DHEAS) ($\mu\text{g/dL}$), 17-OH progesterona (ng/dL), globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (nmol/L), índice androgénico libre (IAL: $\text{testosterona total} \times 3,47 / \text{SHBG} \times 100$) y prolactina (ng/dL) (anexo 5). Todas las determinaciones analíticas formaron parte de la práctica clínica habitual, siendo necesarias para la confirmación del diagnóstico de PCOS, para el control hormonal por la toma OC y/o para el control previo a la exodoncia quirúrgica de terceros molares.

Para llevar a cabo el objetivo 5:

Para cumplir este objetivo, fue necesario seleccionar una subpoblación atendiendo al BMI y variables sociodemográficas y a la presencia/ausencia de PDs.

Aislamiento de PBMCs

Se realizó un sistema de extracción de PBMCs empleando el protocolo de “MACSprep™ PBMC Isolation Kit, human “(Ref. 130-115-169) de Miltenyi Biotec™ con el objetivo de aislar principalmente los linfocitos T, B y monocitos (de entre 1-8 mL de sangre).

Este protocolo se basa en la separación celular inmunomagnética con anticuerpos acoplados a perlas magnéticas. Durante la incubación con una suspensión celular, el complejo anticuerpo/perla se une a las células que

expresan el epítipo correspondiente. Cuando la suspensión celular se coloca en un campo magnético, las células marcadas magnéticamente se retienen, mientras que las células no marcadas se eluyen. Finalmente, para recuperar las células marcadas, se retira del campo magnético, se recogen en un eppendorf, se centrifuga y se almacenan a -80°C hasta su posterior utilización.

Extracción de proteínas y Western blot.

En primer lugar, se resuspende el pellet en un tampón de lisis celular RIPA (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) a 4 °C durante 15 minutos. A continuación, las muestras se agitaron en vórtex durante 30 segundos y se centrifugaron a 13200 g durante 15 minutos a 4 °C.

La cantidad de proteína contenida en la muestra se cuantificó mediante espectrofotometría. Un total de 25 µg de proteína previamente desnaturalizada se resolvió en geles de SDS (del inglés, Sodium Dodecyl Sulfate) de poliacrilamida de gradiente 4-20% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU) junto con un marcador de peso molecular "Precision plus protein Kaleidoscope Standard" (Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU). Tras la electroforesis, las muestras se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Seguidamente, se incubaron los anticuerpos primarios específicos (MCP1 de Abcam™ 10-15 kd, JNK: de Calbiochem™ 54 kd, NFκB de Ivitrogen™ de 65 kd y la actina como control de carga de 42 kd de Sigma-Aldrich™) toda la noche y al día siguiente, se añadieron los anticuerpos secundarios (para MCP1 el BSA [del inglés, Anti-Bovine Albumin] Rabbit monoclonal, para la JNK leche al 5% Rabbit monoclonal, para NFκB leche al 5% Mouse monoclonal y para la actina Rabbit monoclonal) y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. La señal de quimioluminiscencia se detectó añadiendo el reactivo ECL Plus (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), SuperSignal™ West Pico plus o SuperSignal™ West Femto (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) a las membranas. La visualización se llevó a cabo con un sistema de adquisición Fusion FX5 y la cuantificación de la expresión de proteínas se realizó mediante un análisis densitométrico con el software Bio1D v15.03a (Vilber Lourmat, Marne-La Vallée, Francia).

Determinación de citoquinas proinflamatorias

El estudio sérico de las citoquinas proinflamatorias se llevó a cabo mediante tecnología X-MAP de Luminex® 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, EEUU). Realizamos el estudio del perfil inflamatorio evaluando IL6 (pg/mL), TNF α (pg/dL) y MPO (ng/mL) (Milliplex® MAP Human high Sensitivity T cell ref. HSTCMAG-28SK de Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) en muestras de suero que fueron obtenidas durante la extracción sanguínea (en un tubo de gelosa de 8 mL) mediante centrifugación a 2000 g durante 10 minutos a 4 °C y posteriormente almacenadas a -80 °C hasta su procesamiento. Este sistema se basa en la utilización de microesferas con anticuerpos específicos para cada proteína y al producirse la unión microesfera-analito es identificable y cuantificable por un sistema de láser. Los analitos se determinaron por duplicado con coeficientes de variación intraserie e interserie de <5,0% y <15,0%, respectivamente. En todos los casos, se siguieron los procedimientos del fabricante del kit Milliplex® (Millipore Corporation, Billerica, MA, EEUU).

Para la consecución del objetivo 6: Para evaluar la interacción entre las células inmunitarias (neutrófilos) y la monocapa de células endoteliales, se utilizó un modelo de ensayo de adhesión *in vitro*. Este modelo se basa en el uso de una cámara paralela de flujo acoplada a un microscopio invertido (Nikon Eclipse TE2000-S, Nikon Instruments Inc, Amstelveen, Países Bajos) conectado a una cámara de vídeo (Sony Exwave HAD, Koeln, Alemania) (Imagen 3). La cámara se montó encajada en un cubreobjetos con células del cordón umbilical (HUVEC [del inglés, Human Umbilical Vein Endothelial Cells]) HUVEC/TERT 2 (ATCC® CRL-4053™) confluentes (imagen 3).

Aislamiento de los neutrófilos

Los neutrófilos se aislaron empleando el protocolo MACSxpress® “Whole Blood Neutrophil Isolation Kit human” (Ref. 130-104-434) de Miltenyi Biotec™ utilizando 4 mL de sangre con EDTA con el sistema de separación celular inmunomagnética, anteriormente mencionado, pero en este caso se empleó una tecnología sin columna que utiliza microesferas MACSxpress® de tamaño micro.

Las células endoteliales procedentes de cordones umbilicales criopreservadas, de la línea celular HUVEC/TERT 2 (ATCC® CRL-4053™ se cultivaron sobre placas de petri de plástico de 35mm de diámetro recubiertas de fibronectina en un medio completo EGM-2 (del inglés, Endothelial Growth Medium) (Lonza, Basilea, Suiza). Se ajustaron las condiciones de cultivo a 5% CO₂, humedad y temperatura constante de 37 °C. Se comprobó el crecimiento y grado de confluencia en un microscopio invertido (Nikon eclipse Ti-S) diariamente, donde el medio de cultivo se cambiaba cada 48h. El día del experimento, la cámara de flujo se purgaba de posibles burbujas de aire y se hizo pasar una suspensión de 1 millón de neutrófilos en 1 mL de un medio RPMI (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EEUU) a través de la monocapa de HUVEC a 0,36 mL/min mientras se grababa una porción de 5 × 25 mm del cultivo celular durante 5 minutos.

Durante el análisis de vídeo se evaluaron los siguientes parámetros: El flujo de rodamiento de los neutrófilos se calculó contando el número de leucocitos que rodaban sobre 100 µm² de HUVEC en 1 minuto; la velocidad de rodamiento se midió como el tiempo promedio que tardaron 20 leucocitos consecutivos en rodar a lo largo de 100 µm de la monocapa endotelial; y la adhesión se evaluó contando el número de leucocitos que mantenían un contacto firme con el endotelio durante, al menos, 30 segundos por mm². Todas estas mediciones se realizaron con un software de rastreo celular “Tracker” identificando los leucocitos.

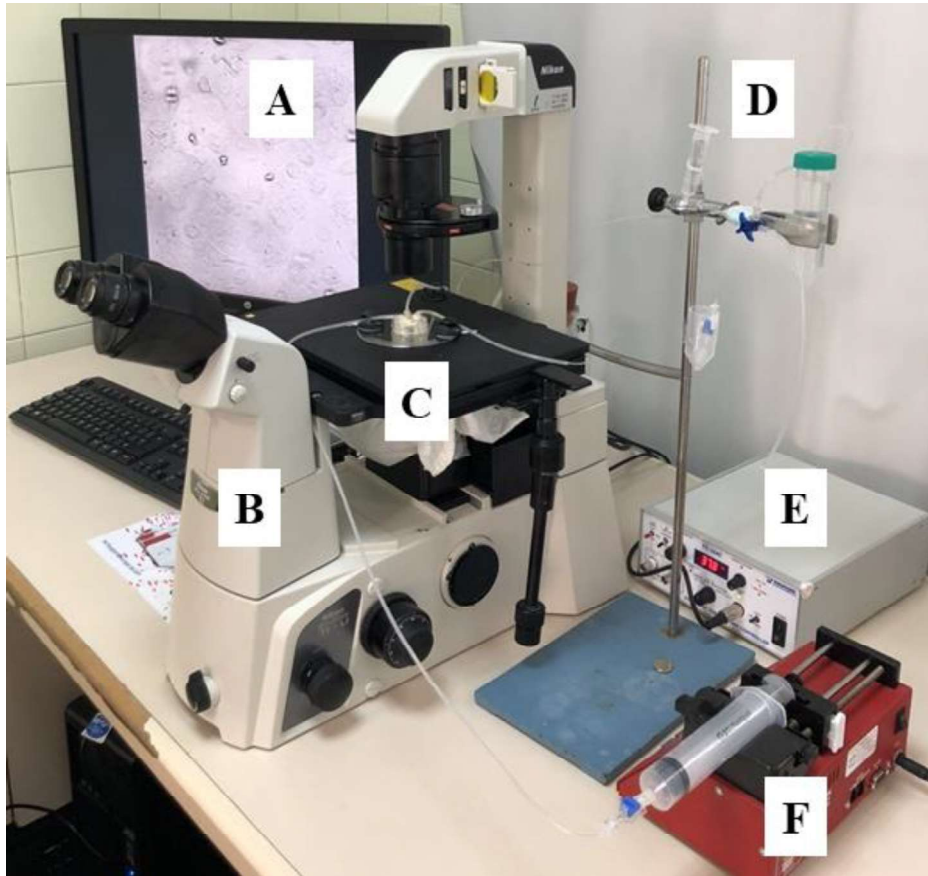


Imagen 3. Montaje del sistema de cámara de flujo en microscopio para analizar la interacción-leucocito endotelio. A. Monitor de ordenador conectado a la videocámara, B. Microscopio y videocámara, C. Cubreobjetos con HUVEC, D. Alícuota de neutrófilos, E. Regulador de temperatura, F. Bomba de perfusión. Elaboración propia. Fuente: Zaida Abad Jiménez, Unidad de Investigación Traslacional en Nutrición y Metabolismo perteneciente a la Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunidad Valenciana (FISABIO).

Niveles séricos de moléculas de adhesión: Para completar el estudio de la función endotelial, se evaluaron los niveles séricos de sICAM1 y sVCAM (Milliplex® MAP Human Cardiovascular Disease ref. HCVD2MAG-67K de Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) mediante la tecnología X-MAP de Luminex® 200 (Luminex Corporation, Austin, TX, EEUU) descrita anteriormente.

Análisis estadístico:

Calculo del tamaño muestral

Se estimó que, una muestra de 90 pacientes sería suficiente para determinar las diferencias entre los casos y los controles (para la determinación de medias de dos muestras independientes) aceptando un riesgo alfa de 0.05 y un riesgo beta de 0.2 en un contraste bilateral. Se precisan 45 sujetos en el primer grupo y 45 en el segundo para detectar una diferencia igual o superior a 1 unidad. Se asume que la desviación estándar (SD) común es de 1.5 mm (o menor, dado que se trata de una sonda que determina diferencias de 1 mm tanto como para la PPD y CAL, de un solo explorador debidamente calibrado y en los estudios previos de casos y controles realizados por nuestro grupo de investigación (28,53,104) se obtuvo una SD en las variables periodontales menor a 1. Se ha estimado una tasa de pérdidas de seguimiento del 20%.

Pruebas estadísticas

Para comprobar la normalidad de los datos se aplicaron las pruebas de normalidad de Shapiro-Wilk y Kolmogorov-Smirnov. Según el resultado de dichas pruebas, podemos diferenciar los parámetros que muestran datos normales, sobre los que aplicamos pruebas paramétricas, y los no normales sobre los que aplicamos pruebas no paramétricas. En todos los test estadísticos aplicados el nivel de significación se estableció con un valor de $p < 0,05$.

Para los datos normales, la estadística descriptiva se realizó por medio de porcentajes y el valor promedio de cada variable según el grupo (PCOS/control). En la estadística inferencial se aplicó la prueba de χ^2 para comparar proporciones de las variables categóricas dicotómicas con el grupo (PCOS/control); el test ANOVA para comparar las diferencias entre la media de variables de más de dos categorías con respecto al grupo (PCOS/control) con su correspondiente prueba post hoc de Bonferroni para conocer dónde se encuentran las diferencias y para comparar las medias de las variables métricas aplicamos el test T de Student para muestras independientes. Se realizaron correlaciones bivariadas de Pearson para conocer si existe una asociación entre

dos variables numéricas y evaluar la tendencia (aumento o disminución) en los datos.

Para los datos que mostraron una distribución no normal, la estadística descriptiva consistió en el cálculo de los rangos promedio, la mediana y los cuartiles (del percentil 25 y 75). Para la estadística inferencial realizamos correlaciones bivariadas de Spearman entre las variables métricas, la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes para analizar las diferencias entre los rangos promedio de las variables métricas con respecto al grupo (PCOS/control), el test de Kruskal Wallis para analizar las diferencias de las variables con más de 2 categorías con respecto al grupo (PCOS/control), y su correspondiente prueba por pares con la corrección de Bonferroni (post hoc no paramétrico) para conocer dónde se encuentran las diferencias.

Para estimar la probabilidad de ocurrencia de algún tipo de PDs por pertenecer al grupo PCOS se calculó la Odds Ratio (OR) sobre las variables dicotómicas obtenidas a partir de las métricas categorizadas en presencia/ausencia de enfermedad (gingivitis+periodontitis/salud periodontal, gingivitis/salud periodontal). También se calcularon las OR a través de las regresiones logísticas empleando las variables que mostraron diferencias significativas entre el grupo PCOS y control.

Además, realizamos modelos predictivos (regresión lineal, regresión logística binaria y regresión polinómica) para conocer el porcentaje de explicación de cada uno de los parámetros estudiados con respecto a pertenecer al grupo PCOS y tener algún tipo de PDs. Se realizó la técnica del árbol de clasificación y regresión CHAID exhaustivo (del inglés, Classification and Regression Trees y Chi-Square Automatic Interaction Detection) entre las variables bioquímicas que mostraron significación con las variables periodontales y el grupo, las hormonas sexuales que mostraron significación con las variables periodontales y el grupo y las proteínas determinadas en el perfil inflamatorio que mostraron asociación con las variables periodontales y el grupo.

RESULTADOS

RESULTADOS

Estadística descriptiva del grupo PCOS y control

Características sociodemográficas

Se analizaron 145 pacientes, siendo la edad media del grupo PCOS 27,9 años ($\pm 5,66$ años) y 28,1 años en el grupo control ($\pm 5,91$ años) sin diferencias significativas (T de Student $p=0,844$). En cuanto el nivel de estudios alcanzados, en su mayoría se trató de pacientes con un nivel de formación alto, el 52,7% de las PCOS y el 45,0% de las controles manifestaron tener estudios de grado universitario (incluido en este grupo diplomaturas y licenciaturas), un 8,1% y 19,7% (PCOS y controles respectivamente) estudios de máster o doctorado. Un 28,3% de las PCOS presentó un nivel estudios intermedios (formación profesional superior y bachillerato) siendo este porcentaje similar en el grupo control (23,9%). El 8,10% y 2,81% presentaron estudios medios (secundaria y formación profesional de grado medio) y el 2,70% y 4,22 % estudios básicos (primaria y programas de cualificación iniciales) en el grupo PCOS y controles respectivamente.

El grado de formación académica, no mostró diferencias significativas entre casos y controles (ANOVA $p=0,097$) (tabla 5). La situación laboral en el momento del estudio fue en la categoría “trabajador activo” del 62,1% en el grupo PCOS y un 70,4% en el grupo control, un 33,7% y 23,9% eran estudiantes y 4,05% y 5,63% estaban en situación de desempleo (PCOS y controles respectivamente), sin diferencias significativas (ANOVA $p=0,418$) (tabla 5).

Historia clínica y medicación recibida

Tras realizar la anamnesis y completar la historia clínica de las pacientes, ninguna de las pacientes presentó antecedentes médicos de interés (en ambos grupos) descartándose la presencia de diabetes, hepatopatías, cardiopatías, enfermedades musculoesqueléticas, disfunción pulmonar (incluida apnea hipopnea del sueño), episodios pasados de patologías cancerosas y sólo una paciente del grupo PCOS, refirió haber tenido un episodio de hacía más de 3 años de hipertensión arterial. Dos pacientes PCOS y una control presentaron

alergias, sin establecerse diferencias significativas entre los grupos (χ^2 $p=0,584$) (tabla 5).

En cuanto a la toma de medicación, en el grupo PCOS 11 pacientes (14,8%) registraron la toma de metformina durante un tiempo promedio de 6 meses, mientras que en el grupo control ninguna paciente registró la toma de metformina, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (χ^2 $p<0,001$). De igual modo, se encontraron diferencias en cuanto a la toma de OC. Se registró la toma de OC en 39 pacientes del grupo PCOS (52,7%), frente a 8 pacientes en el grupo control (11,2%) (χ^2 $p<0,001$) (tabla 5). El tiempo de la toma de OC fue significativamente mayor en el grupo PCOS (T de Student $p<0,001$) comparado con el grupo control.

En el grupo PCOS, se observó una media en el tiempo de toma de OC de aproximadamente 2 años (22,3 meses) y en el grupo control se registraron tiempos menores, siendo 3,7 meses de media.

Antropometría y tensión arterial

La media del peso corporal, el contorno de la cintura, el contorno de la cadera, el BMI, índice WSR, índice WHR y la DBP, fueron significativamente mayores en las pacientes con PCOS comparado con las controles. La talla y la SBP no mostraron diferencias significativas entre los grupos (tabla 5).

Hábitos de higiene oral, tabaquismo y alcohol

En general, podemos observar cómo se trató de una población con buenos hábitos de higiene oral, en su mayoría con una frecuencia del cepillado dental de más de 2 veces al día. Sin embargo, hubo diferencias entre los hábitos de higiene oral del grupo PCOS frente al de controles, destacando sobre todo la frecuencia del cepillado dental de solo 1 vez al día en el grupo PCOS del 14,8% frente al 1,4% del grupo control (ANOVA $p=0,031$) (tabla 5). El uso de elementos para la higiene interdental (cepillos interproximales, seda y arcos interdentes) no mostró diferencias significativas entre el grupo PCOS y el grupo control.

La frecuencia de visitas al odontólogo fue similar entre PCOS y controles, habiendo acudido en su mayoría hacía menos de un año a la su última cita, sin

diferencias significativas (tabla 5). El consumo de alcohol y tabaco fue similar en ambos grupos, sin mostrar diferencias significativas.

Tabla 5. Análisis descriptivo de los parámetros sociodemográficos, medicación, hábitos de higiene oral, hábitos tóxicos, antropometría y la tensión arterial.

Parámetros	CONTROL (n=71)	PCOS (n=74)
Sociodemográficos		
Edad (años)	28,1 ± 5,91	27,9 ± 5,66
Nivel de Estudios:		
<i>Grado /Diplomatura % (n)</i>	45,0 (32)	52,7 (39)
<i>Máster/Doctorado % (n)</i>	19,7 (14)	8,10 (6)
<i>Bachiller/FP superior % (n)</i>	23,9 (17)	28,3 (21)
<i>ESO/FP medio</i>	2,81 (2)	8,10 (6)
<i>Básicos/Primaria % (n)</i>	4,22 (3)	2,70 (2)
Ocupación:		
<i>Trabajador activo % (n)</i>	70,4 (50)	62,1 (46)
<i>Estudiante % (n)</i>	23,9 (17)	33,7 (25)
<i>Desempleado % (n)</i>	5,63 (4)	4,05 (3)
Medicación		
OC:		
<i>Si toma % (n)</i>	11,2 (8)	52,7 (39)***
<i>No toma % (n)</i>	88,7 (63)	47,2 (35)
Metformina:		
<i>Si toma % (n)</i>	0 (0)	14,8 (11)***
<i>No toma % (n)</i>	100 (71)	85,1 (63)
Frecuencia de cepillado dental		
<i>≥2 veces/día % (n)</i>	94,3 (67)	78,3 (58)
<i>1 vez al día % (n)</i>	1,40 (1)	14,8 (11)*
<i><1 vez al día % (n)</i>	4,22 (3)	6,75 (5)
Uso de elemento de higiene interdental		
<i>Si usa % (n)</i>	47,8 (34)	40,5 (30)
<i>No usa % (n)</i>	52,1 (37)	59,4 (44)
Tiempo desde la última visita al dentista		
<i>≥5 años % (n)</i>	7,04 (5)	9,45 (7)
<i>1-5 años % (n)</i>	29,5 (21)	31,0 (23)
<i><1 año % (n)</i>	63,3 (45)	59,4 (44)

Parámetros	CONTROL (n=71)	PCOS (n=74)
Alcohol		
Si % (n)	35,2 (25)	35,1 (26)
No % (n)	64,7 (46)	64,8 (48)
Frecuencia del consumo de alcohol al día		
<1 bebida % (n)	32,4 (23)	22,9 (17)
2 bebidas % (n)	4,22 (3)	8,10 (6)
3 bebidas % (n)	0 (0)	2,70 (2)
4 bebidas % (n)	0 (0)	1,35 (1)
≥5 bebidas % (n)	0 (0)	2,70 (2)
No he bebido en los últimos 30 días	63,3(45)	62,1 (46)
Tabaco		
SI % (n)	16,9 (12)	21,6 (16)
NO % (n)	74,6 (53)	66,2 (49)
Ex fumador % (n)	8,5 (6)	12,2 (9)
Antropometría		
Peso (Kg)	60 (55,5, 66,5)	67,8 (59,0, 81,7)***
Talla (m)	1,65 ± 0,059	1,63 ± 0,057
Cintura (cm)	70 (67,0, 76,0)	77,0 (71,0, 90,0)***
Cadera (cm)	95 (90,0, 101,0)	100 (94,7, 114,2)***
BMI (kg/m ²)	22,0 (22,2, 24,6)	24,5 (21,3, 30,1)***
WSR (cm/cm)	0,410 (0,390, 0,460)	0,470 (0,420, 0,542)***
WHR (cm/cm)	0,740 (0,700, 0,760)	0,760 (0,727, 0,800)***
Tensión arterial		
SBP (mm Hg)	109 (102,0, 116,0)	110 (102,7, 117,2)
DBP (mm Hg)	75 (70,0, 80,0)	77 (72,0, 85,2)*

Se presentan los datos con la media ± la SD para variables paramétricas o como mediana y el rango de los cuartiles (del percentil 25% y 75%) para las no paramétricas. Se utilizó una T de Student para muestras independientes o una U de Mann Witney para muestras independientes según la distribución de la variable, y el test χ^2 para proporciones. BMI: índice de masa corporal (peso en kg/ talla en metros²); DBP: tensión arterial diastólica; ESO: educación secundaria obligatoria; FP: formación profesional; OC: anticonceptivos orales; SBP: tensión arterial sistólica; WHR: índice cintura/talla; WSR: índice cintura/cadera. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Bioquímica y hormonas sexuales

Bioquímica

Se encontraron valores significativamente más altos de insulina, HOMA y el porcentaje de A1c en el grupo PCOS frente al grupo control (tabla 6). La IR se registró en el 22,9% de las PCOS frente al 0% del grupo control, estableciéndose asociación significativa (chi 2 $p < 0,001$). Podemos observar como existe una alteración del perfil lipídico en el grupo PCOS, registrándose valores más altos de colesterol total, LDLc y triglicéridos y valores menores de HDLc, cuando comparamos las medias de las pacientes PCOS frente a las controles, de forma estadísticamente significativa (tabla 6).

Los valores promedio de hsCRP, C3 y RBP4 resultaron más altos en el grupo PCOS comparado con el grupo control, de forma estadísticamente significativa. La glucosa, el fibrinógeno y la homocisteína plasmática no mostraron diferencias significativas entre los grupos (tabla 6).

Hormonas sexuales

En el grupo PCOS se encontraron valores inferiores de FSH y LH comparado con las controles, y valores mayores de índice de androgénico libre, pero de forma no significativa ($p < 0,100$). Se encontraron diferencias significativas entre los valores de estradiol y 17OH-progesterona comparando las PCOS y las controles. El grupo PCOS presentó valores significativamente menores de estradiol y de 17OH-progesterona, comparado con el grupo control (tabla 6).

Tabla 6. Análisis descriptivo e inferencial de las variables bioquímicas y hormonas sexuales comparando el grupo PCOS con el grupo control.

Parámetros	CONTROL (n=71)	PCOS (n=74)
Bioquímicos		
Glucosa (mg/dL)	85,0 ± 7,71	87,0 ± 12,6
Insulina (μUI/mL)	6,76 ± 1,82	10,0 ± 5,63***
HOMA	1,43 ± 0,565	2,28 ± 1,82***
IR % (n)	0, 0	22,9 (17)*
A1c (%)	5,03 ± 0,285	5,14 ± 0,224*
Colesterol (mg/dL)	176,0 (155,0, 190,0)	186,5 (166,7, 212,5)**
HDLc (mg/dL)	64,6 ± 33,4	59,6 ± 31,1*
LDLc (mg/dL)	99,0 ± 14,3	112,8 ± 16,6**

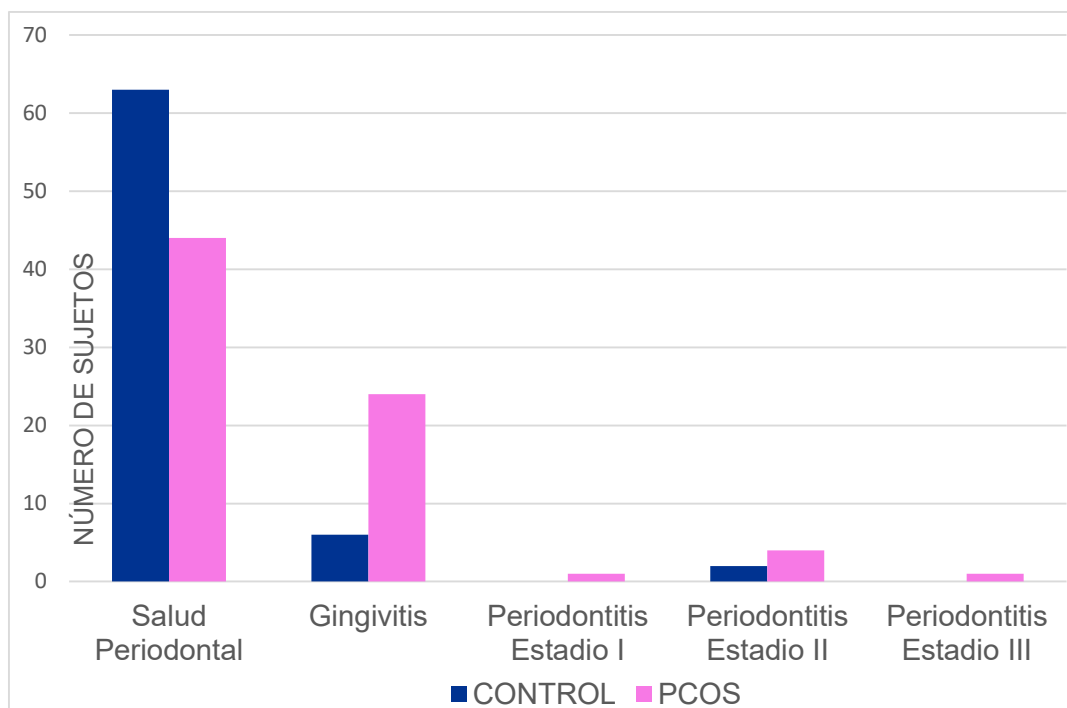
Parámetros	CONTROL (n=71)	PCOS (n=74)
Triglicéridos (mg/dL)	65,0 ± 27,2	92,5 ± 47,2***
hsCRP (mg/L)	0,730 (0,32, 2,63)	3,71 (0,990, 7,06)***
Fibrinógeno (mg/dL)	403,6 ± 42,8	427,9 ± 116,9
C3 (mg/dL)	104,0 ± 43,9	126,04 ± 19,0***
Homocisteína (µmol/L)	9,46 ± 1,48	10,1 ± 9,86
RBP4 (mg/dL)	1,84 ± 0,467	2,19 ± 0,551***
Hormonas sexuales		
FSH (mUI/dL)	3,90 (2,60, 5,00)	4,10 (1,95, 5,42)
LH (mUI/dL)	3,90 (2,80, 5,80)	3,70 (1,70, 5,62)
Estradiol (pg/mL)	55,0 (23,0, 136,0)	32,5 (10,0, 60,5)***
Testosterona (ng/dL)	0,404 ± 0,202	0,432 ± 0,187
Androstendiona (ng/mL)	3,20 ± 1,22	3,71 ± 4,56
DEAHS (µg/dL)	276,0 ± 346,0	285,4 ± 123,9
17OH (ng/dL),	1,29 (0,787, 2,23)	0,795 (0,567, 1,19)***
SHBG(µg/dL),	74,0 (57,0, 95,0)	93,5 (39,7, 192,7)
IAL (%)	1,87 ± 1,08	2,51 ± 2,30
Prolactina (ng/dL).	21,7 ± 10,7	19,7 ± 10,9

Los datos se expresan como media ± SD para variables paramétricas y como mediana e intercuartiles 25 y 75 para variables no paramétricas. Se utilizó una T de Student para muestras independientes o una U de Mann Witney para muestras independientes según la distribución de la variable y el test chi² para proporciones. A1c%: porcentaje de hemoglobina glicosilada; C3: complemento 3; DEAHS: dehidroepiandrosterona sulfato; FSH: folículo estimulante; HDLc: colesterol de alta densidad; hsCRP: proteína C reactiva ultrasensible; IAL: índice de androgénico libre en porcentaje; IR: resistencia a la insulina dicotómica teniendo en cuenta IR= HOMA≥3; LDLc: colesterol de baja densidad; LH: luteinizante; 17OH: 17 hidroxiprogesterona; RBP4: proteína fijadora de retinol A; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Objetivo 1: Valoración del estado periodontal

En total, 38 pacientes (26,2%) registraron la presencia de algún tipo de PDs, mientras que las restantes 107 pacientes (73,7%) fueron periodontalmente sanas. Dentro del grupo de pacientes que presentaron PDs el 78,8% fueron PCOS (n=30, 40,5% del grupo PCOS) y un 21,1% fueron controles (n=8, 11,2% del grupo control), existiendo una prevalencia significativamente más alta de PDs en el grupo PCOS ($\chi^2 p < 0,0001$) (figura 13). Esta proporción significativa más alta de PDs en el grupo PCOS, establece una probabilidad 5,36 (OR, IC95% 2,25-12,81) veces mayor de padecer algún tipo de PDs en el grupo PCOS y de 5,72 veces (OR, IC95% 2,16-15,16) si analizamos concretamente la prevalencia de gingivitis. Aunque la prevalencia de la periodontitis fue mayor en el grupo PCOS (8,10% frente al 2,81% en el grupo control) estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ($\chi^2 p = 0,163$). En el grupo PCOS, 1 paciente presentó periodontitis estadio I grado B, 4 pacientes periodontitis estadio II (3 grado A y 1 grado B) y 1 paciente presentó periodontitis estadio 3 grado B. En el grupo control, las dos pacientes con periodontitis fueron estadio II grado B.

Figura 13. Distribución de la población de estudio según el estado periodontal acorde a la clasificación actual.



PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico.

Parámetros periodontales recogidos en el periodontograma

En cuanto a media de PPD y CAL, no se encontraron diferencias significativas entre los dos grupos, tampoco con la media del número de dientes con bolsas periodontales (tabla 7). El número de pacientes que presentaron bolsas fue similar en el grupo PCOS y control (χ^2 $p=0,062$) aunque existe una tendencia a que aumente en el grupo PCOS. Sin embargo, la media del número de dientes con $CAL \geq 4$ mm fue mayor en el grupo PCOS, siendo este parámetro un indicador del inicio de afectación periodontal. El número de pacientes que presentaron en algún diente un $CAL \geq 4$ mm, mostró una proporción mayor en el grupo PCOS comparado con el grupo control. El 75,0% de las pacientes del grupo PCOS presentó al menos 1 diente con $CAL \geq 4$ mm, frente al 25,0% del grupo control, de forma estadísticamente significativa (χ^2 $p=0,042$).

Se tuvo en cuenta la magnitud y el origen (si fuera conocido) de las recesiones para establecer evidencias que muestran el inicio de la periodontitis, o las secuelas presentes en periodonto sano reducido. El número de pacientes con presencia de recesiones en el grupo control fue 3 y se trató de recesiones por causa no periodontal (2 por exodoncia de cordales y 1 por ortodoncia de tracción de diente retenido), mientras que en el grupo PCOS, 12 pacientes presentaron recesiones por causa periodontal. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas (χ^2 $p=0,018$) calculándose una OR para la presencia de recesiones en el grupo PCOS de 4,38 (IC95% 1,18-16,27).

La inflamación gingival (determinada con el BOP) fue mayor en el grupo PCOS. La media de BOP en el grupo PCOS fue de 7,04% de frente a un 3,00% en el grupo control. La pérdida ósea radiográfica y el índice de cálculo no mostró diferencias entre los grupos, mientras que el índice de placa fue mayor en el grupo PCOS (tabla 7). No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de pérdida ósea radiográfica y el índice de cálculo entre el grupo PCOS con el grupo control (tabla 7). Ninguna de las pacientes presentó ausencias dentales por causa periodontal, el 74,3 % de las PCOS presentan todos sus dientes, y al igual que el 85,9% de las controles. Dentro de las causas de pérdida de dientes destacan la ortodoncia (12 PCOS y 6 controles) seguido de caries (5 PCOS y 4 controles), y por último 2 PCOS presentaron ausencias por traumatismo, sin diferencias significativas. Ninguna de las pacientes

presentó afectación de furcas ni movilidad dental. En cuanto a los tratamientos periodontales recibidos, la mayoría de las pacientes había recibido alguna vez una tartrectomía con ultrasonidos (78,4 % de las PCOS y 78,9% de las controles), sólo 6 pacientes PCOS (8,10%) se habían realizado anteriormente un SRP (hacía más de 1 año), mientras que en el grupo control ninguna paciente había recibido tratamiento periodontal (tabla 7).

Tabla 7. Análisis descriptivo e inferencial del estado periodontal con respecto al grupo PCOS y control.

Parámetros	CONTROL (n=74)	PCOS (n=71)
Clasificación de PDs		
Sano % (n)	88,7 (63)	40,5 (44) ^{***}
Gingivitis %(n)	8,45 (6)	32,4 (24) ^{***}
Periodontitis E I % (n)	0 (0)	1,35 (1)
Periodontitis E II %(n)	2,81 (2)	5,40 (4)
Periodontitis E III % (n)	0 (0)	1,35 (1)
Extensión de Periodontitis		
Localizada % (n)	1,40 (1)	6,75 (5)
Generalizada % (n)	1,40 (1)	1,35 (1)
Periodontograma		
PPD (mm)	1,51 (1,35, 1,63)	1,58 (1,39, 1,82)
CAL (mm)	1,51 (1,35, 1,64)	1,58 (1,41, 1,82)
BOP (%)	1,78 (0,00, 4,46)	5,35 (1,83, 11,6) ^{***}
Pérdida ósea (%)	0,952 ± 4,56	2,14 ± 7,29
Índice de Placa	0,445 ± 0,452	0,728 ± 5,26*
Índice de Cálculo	0,075 ± 0,276	0,089 ± 0,278
N.º ausencias dentales	0,394 ± 1,38	0,554 ± 1,24
N.º de dientes PPD+	0,630 ± 2,52	0,930 ± 2,47
N.º de dientes CAL+	0,080 ± 0,405	0,470 ± 1,29*
Tratamiento		
Nunca % (n)	21,1 (15)	13,6 (10)
Tartrectomía % (n)	78,9 (56)	78,3 (58)
SRP % (n)	0 (0)	8,10 (6) [*]

Los datos se expresan como media ± SD para variables paramétricas y como mediana e intercuartiles 25 y 75 para variables no paramétricas. Se utilizó una T de Student para muestras independientes o una U de Mann Witney para muestras independientes según la distribución de la variable y el test χ^2 para proporciones. BOP%: porcentaje de sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica, CAL+: nivel de inserción clínica ≥ 4 mm; E: estadio; PDs: enfermedades periodontales; PPD: profundidad de sondaje; PPD+: profundidad de sondaje ≥ 4 mm; SRP: raspado y alisado radicular. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Objetivo 2: Influencia de los hábitos de higiene oral, tabaquismo y alcohol sobre el estado periodontal de los grupos

La frecuencia de cepillado dental mostró una asociación significativa con mayores valores de PPD ($p=0,006$), CAL ($p=0,006$), BOP ($p=0,023$) y el índice de placa ($p=0,000$) sin mostrar diferencias con el número de dientes con $CAL \geq 4$ mm ($p=0,698$), el n.º de dientes con bolsas ($p=0,054$) ni el n.º de dientes ausentes ($p=0,849$), tras aplicar el test de Kruskal Wallis. Las diferencias se encontraron entre el grupo que presentó un cepillado dental de más de 2 veces al día frente a aquellas que mostraron el cepillado dental con una frecuencia menor a 1 vez al día (en todas las variables significativas) tras aplicar la prueba por pares con la corrección de Bonferroni (post hoc no paramétrico). La frecuencia de cepillado dental también se asoció a una mayor prevalencia de PDs (ANOVA $p=0,004$), encontrándose las diferencias entre el grupo cepillado dental de más de 2 veces al día frente a al cepillado dental menor de 1 vez al día (post hoc de Bonferroni $p=0,003$), siendo el grupo de frecuencia del cepillado dental menor de 1 vez al día el que mostró mayor prevalencia de PDs.

El hábito tabáquico se asoció a un mayor n.º de dientes con bolsas ($p=0,016$), sin mostrarse diferencias en las variables CAL ($p=0,073$), n.º de dientes con $CAL \geq 4$ mm ($p=0,319$) BOP ($p=0,290$) y n.º de dientes ausentes ($p=0,588$) tras aplicar el test Kruskal Wallis. No se encontró asociación entre el tabaquismo y la presencia de PDs con el test ANOVA ($p=0,435$). Este hábito no mostró diferencias entre casos y controles (ANOVA $p=0,536$).

El consumo de alcohol no mostró asociación significativa con ninguna de las variables periodontales tras aplicar la prueba U de Mann Whitney (PPD $p=0,336$, CAL $p=0,349$, BOP $p=0,134$, n.º de dientes con $CAL \geq 4$ mm $p=0,875$, n.º de dientes con bolsas $p=0,907$, número de dientes ausentes $p=0,288$). Tampoco se encontró una mayor prevalencia de PDs en el grupo que registró el consumo de alcohol y no se encontró asociación significativa entre la presencia de PDs y el consumo de alcohol tras aplicar el test χ^2 ($p=0,350$). La asociación entre la frecuencia de consumo de bebidas alcohólicas y la presencia de PDs con el test

ANOVA tampoco fue significativa ($p=0,549$). Ni el consumo de alcohol (ANOVA $p=0,992$) ni la frecuencia de dicho consumo (ANOVA $p=0,236$) mostró asociación significativa con el grupo PCOS o control.

Para determinar la importancia de la higiene oral ante el desarrollo de PDs, frente a la importancia de pertenecer al grupo PCOS, realizamos un modelo logístico con ambas variables. Al realizar este modelo vemos como tanto la baja frecuencia de cepillado dental, como el pertenecer al grupo PCOS forman parte de los factores de riesgo ante el desarrollo de PDs. Las pacientes que presentan un cepillado dental de menos de 1 vez al día presentan una probabilidad 11,5 veces mayor de presentar algún tipo de PDs comparado con aquellas que mostraron mejores hábitos de higiene. Asimismo, el grupo PCOS mostró una probabilidad 5,78 veces mayor de padecer PDs comparado con el grupo control. Por ello, podemos observar cómo tanto el PCOS como la higiene oral son factores que pueden aumentar la probabilidad ante el desarrollo de PDs (tabla 8).

Tabla 8. Regresión logística binaria siendo la variable dependiente la presencia de PDs y las variables independientes la higiene oral y el grupo.

Variables de la ecuación (modelo $p=0,000$)***					
	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
Higiene oral 1	2,44	1	0,008**	11,5	1,91 – 69,6
Higiene oral 2	-0,081	1	0,904	0,922	0,247 – 3,44
Grupo PCOS	1,756	1	0,000***	5,78	2,27 - 14,7
constante	-2,269	1	0,000***	0,103	

Modelo de regresión logística binaria aplicando el método de entrar siendo la variable dependiente la presencia de PDs y las variables independientes el grupo PCOS y la frecuencia de cepillado dental (variable higiene oral 1= cepillado ≤ 1 vez al día, higiene oral 2= cepillado dental ≥ 2 veces al día). B: exponente de la regresión para la variable; gl: grados de libertad; Exp (B): exponente beta correspondiente al valor de la OR; IC 95%: Intervalo de Confianza del 95% para la OR. ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Objetivo 3: Asociación entre la toma de medicación, el estado periodontal y el grupo

Para estudiar la influencia de la toma de OC sobre las variables periodontales, se realizó la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes, sin encontrarse diferencias significativas entre las medias de PPD ($p=0,480$), CAL ($p=0,838$), BOP ($p=0,139$), número de dientes con bolsas ($p=0,349$), n.º de dientes con $CAL \geq 4$ mm ($p=0,974$) y el número de dientes ausentes ($p=0,883$) de las pacientes que tomaron OC frente a las pacientes que no tomaron OC.

En total, de las 47 pacientes que tomaron OC, el 40,4% presentaron PDs siendo esta proporción estadísticamente significativa ($\chi^2 p=0,007$) respecto a las pacientes que no tomaron OC. La toma de OC fue significativamente mayor en el grupo PCOS ($\chi^2 p < 0,001$).

Para estudiar la influencia de la toma de metformina sobre las variables periodontales, se realizó la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes, sin encontrarse diferencias significativas de las medias de PPD ($p=0,388$), CAL ($p=0,758$), BOP ($p=0,077$), n.º de dientes con bolsas ($p=0,267$) ni el n.º de dientes ausentes de las pacientes ($p=0,068$) entre el grupo que tomó metformina frente al que no tomó.

Para conocer si las pacientes que tomaron metformina tenían diferencias con respecto a la presencia/ausencia de PDs frente a aquellas que no tomaron metformina, realizamos un test de χ^2 sin encontrarse diferencias significativas ($p=0,832$).

Para determinar la probabilidad que presenta el grupo PCOS de tomar anticonceptivos y metformina comparado con el grupo control, realizamos una regresión logística binaria.

Con este modelo podemos ver cómo tanto la toma de OC como la toma de metformina se asoció al grupo PCOS. Las pacientes con PCOS mostraron una probabilidad 7,79 veces mayor de tomar OC y de 16,7 veces mayor de tomar metformina comparando con el grupo control (tabla 9).

Tabla 9. Regresión logística binaria introduciendo como variable dependiente el grupo PCOS con el método de entrar.

Variables de la ecuación (modelo p=0,000)***					
	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
Toma de OC	2,05	1	0,000**	7,79	3,11 – 19,5
Toma de Metformina	2,81	1	0,010**	16,7	1,98 – 142,4
constante	0,394	1	0,383	1,48	

Modelo de regresión logística binaria introduciendo como variable dependiente el grupo PCOS y como variables independientes la presencia de PDs, la toma de metformina y la toma de OC. B: exponente de la regresión para la variable; gl: grados de libertad; Exp (B): exponente beta correspondiente al valor de la OR; IC 95%: Intervalo de Confianza del 95% para la OR; OC: anticonceptivos orales. **p<0,01; ***p<0,001.

Para conocer la influencia de pertenecer al grupo PCOS, la toma de metformina y la toma de OC sobre la presencia de PDs y determinar de esta forma cuál de ellas tiene mayor influencia, realizamos un modelo logístico. En este modelo, podemos observar como la variable significativa con respecto a la presencia de PDs fue la variable grupo (teniendo como referencia la categoría 1= PCOS), mostrando una OR de 4,89, mientras que la toma de OC y metformina no presentó resultados significativos en el modelo (tabla 10).

Tabla 10. Regresión logística binaria siendo la variable dependiente la presencia de PDs, utilizando el método de entrar.

Variables de la ecuación (modelo p=0,000)***					
	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
Grupo PCOS	1,58	1	0,001**	4,89	1,87 - 12,7
Toma OC	-0,421	1	0,336	0,656	0,278 – 1,54
Toma Metformina	0,515	1	0,430	1,673	0,466 – 6,00
constante	-2,29	1	0,151	0,100	

Modelo de regresión logística binaria aplicando el método de entrar siendo la variable dependiente la presencia de PDs y las variables independientes el grupo PCOS, la toma de OC, y la toma de metformina. B: exponente de la regresión para la variable; gl: grados de libertad; Exp (B): exponente beta correspondiente al valor de la OR; IC 95%: Intervalo de Confianza del 95% para la OR; OC: anticonceptivos orales. **p<0,01.

Objetivo 4

4.1 Asociación entre la antropometría, el estado periodontal y el grupo

Las variables BMI, WSR y WHR que fueron significativamente más altas en el grupo PCOS (tabla 5), se asociaron significativamente a la presencia de PDs tras aplicar la prueba U de Mann Whitney. La mediana del BMI en el grupo con PDs fue de 26,8 (22,2, 30,6) frente a la mediana de 22,6 (20,4, 25,5) de las pacientes sin PDs (U de Mann Whitney $p < 0,001$).

La mediana del WSR en el grupo con PDs fue 0,470 (0,470, 0,545) y de 0,420 (0,400, 0,470) en el grupo sin PDs, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p < 0,001$). Lo mismo ocurrió con el índice WHR, que mostró una mediana de 0,775 (0,720, 0,800) en el grupo con PDs, y en el grupo sin PDs fue de 0,740 (0,710, 0,770) siendo estos valores estadísticamente significativos (U de Mann Whitney $p = 0,011$). Para determinar la probabilidad del grupo PCOS a presentar mayores valores antropométricos por el aumento del BMI, realizamos un modelo logístico. El grupo PCOS mostró una probabilidad 1,15 veces mayor (IC95% de la OR=1,06-1,24) de presentar un promedio mayor de BMI comparado con el grupo control.

Correlaciones bivariadas entre la antropometría y los parámetros periodontales

Teniendo en cuenta a la muestra en total, el BMI se correlacionó positivamente con el BOP, el PPD y en n.º de dientes con $PPD \geq 4$ mm. De igual manera, el WSR, se correlacionó positivamente con el BOP, CAL, PPD, n.º de dientes con $PPD \geq 4$ mm y el n.º de dientes con $CAL \geq 4$ mm; mientras que el índice WHR se correlacionó positivamente con todos los parámetros periodontales menos la PPD. Estas correlaciones fueron similares en el grupo PCOS, mientras que en el grupo control, el WHR no se correlacionó con ninguno de los parámetros periodontales (tabla 11). Cabe destacar que en el grupo PCOS, que presentó valores significativamente mayores en la media BOP, se encontraron correlaciones bivariadas positivas significativas entre el BMI, los índices WSR y WHR con el BOP, mientras que en el grupo control estas correlaciones no fueron significativas (tabla 11). El n.º de dientes con bolsas periodontales se

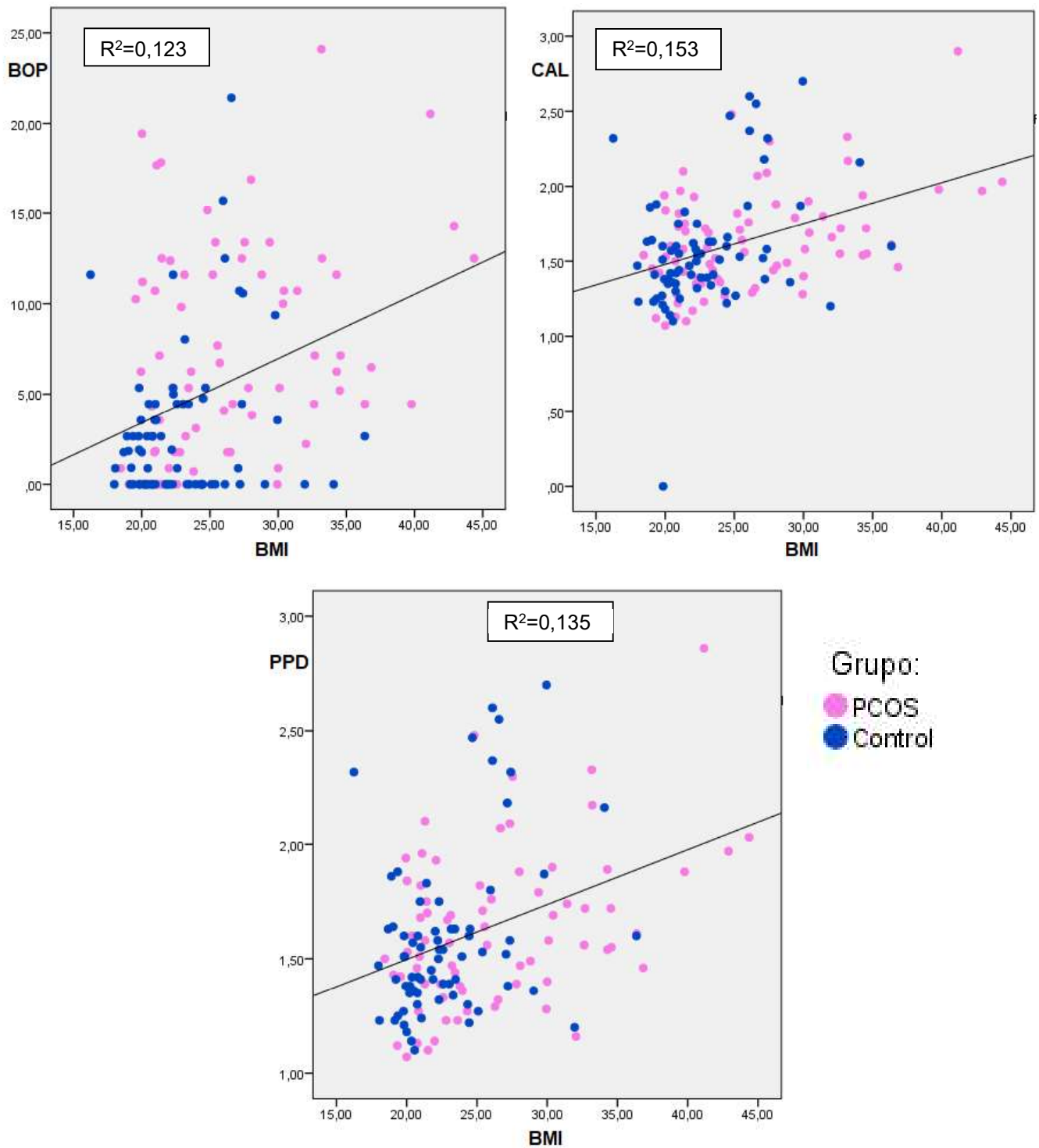
correlacionó positivamente con el BMI y el WSR, tanto en la población total del estudio como en el grupo PCOS, mientras que en el grupo control estas correlaciones no fueron significativas. Podemos observar como existe una asociación entre los parámetros antropométricos y los parámetros periodontales, de forma que a medida que aumentan los valores antropométricos, existe un empeoramiento de los parámetros periodontales, y que dichas correlaciones se presentan principalmente en el grupo PCOS (figura 14).

Tabla 11. Correlaciones bivariadas de Spearman entre los parámetros periodontales y los parámetros antropométricos.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
BMI					
P. total	0,360***	0,383***	0,342***	0,362***	0,155
Controles	0,127	0,321**	0,296*	0,203	0,242
PCOS	0,329**	0,366***	0,326**	0,425***	0,052
WSR					
P. total	0,378***	0,317**	0,270***	0,364***	0,202*
Controles	0,134	0,354**	0,325**	0,226	0,296*
PCOS	0,340**	0,257*	0,215	0,404***	0,083
WHR					
P. total	0,267***	0,154	0,128	0,205*	0,210*
Controles	0,040	0,161	0,141	0,078	0,165
PCOS	0,242*	0,046	0,027	0,221	0,167

BMI: índice de masa corporal (peso en kg/talla en metros²); BOP: porcentaje de sangrado al sondaje; CAL: pérdida de inserción clínica en milímetros; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL \geq 4 mm; N.º d. PPD+: número de dientes con bolsas \geq 4 mm; P. total: población total del estudio; WHR: índice cintura/cadera (cm/cm); WSR: índice cintura/talla (cm/cm). * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Figura 14. Regresiones lineales simples el BOP, CAL y PPD con el BMI.



BOP: sangrado al sondaje; BMI: índice de masa corporal; CAL: nivel de inserción clínica; PPD: profundidad de sondaje.

Aunque se trate de regresiones con un coeficiente bajo, se observa como existe una relación entre las variables antropométricas y las periodontales (figura 14). Tanto la inflamación gingival (determinada con el BOP) como la inserción periodontal (cuantificada con el CAL y PPD), se ven influenciadas por el BMI. Al mismo tiempo, los WHR y WST mostraron regresiones lineales muy similares, dado la colinealidad que presentaron con el BMI. Podemos observar como el aumento del BMI se asocia a un empeoramiento de los parámetros periodontales, de forma estadísticamente significativa (el p valor de las regresiones de BOP, CAL y PPD fue $p \leq 0,001$).

Para realizar un modelo predictivo, e investigar cómo influyen estas variables en el proceso de aparición de PDs, llevamos a cabo una regresión logística binaria. Dado que la variable BMI incluye los cambios en el peso y la talla y además presentó colinealidad con los demás parámetros antropométricos, fue introducida como variable representativa de la antropometría. Por ello, se introdujo en el modelo logístico junto con la variable grupo (que diferencia casos y controles). Se obtuvo un modelo significativo en la regresión logística, estableciéndose mayor probabilidad de padecer PDs en aquellas pacientes con mayor BMI y siendo también significativa pertenecer al grupo PCOS (tabla 12). En este modelo podemos ver como por cada punto que aumenta el BMI, teniendo en cuenta la media de la población estudiada, la probabilidad de presentar PDs aumenta en un 9%.

Tabla 12. Regresión logística binaria siendo la variable dependiente la presencia de PDs y las variables independientes el BMI y el grupo.

Variables de la ecuación (modelo $p=0,001$)**					
	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
BMI	0,088	1	0,018	1,09	1,01 – 1,17
Grupo	-1,40	1	0,002	0,246	0,100 – 0,608
constante	-2,72	1	0,008	0,065	

Modelo de regresión logística binaria por el método entrar. B: coeficiente de la variable; Exp (B): exponente B equivalente al valor de OR; BMI: índice de masa corporal; gl: grados de libertad.

4.2 Asociación entre los parámetros bioquímicos, el estado periodontal y el grupo

Para conocer cómo influyen los parámetros bioquímicos asociados al PCOS sobre la presencia de PDs, buscamos diferencias significativas entre los valores promedio de dichos parámetros bioquímicos, en base a la presencia/ausencia de PDs. Dado que las pacientes del grupo PCOS mostraron valores significativamente mayores de insulina, HOMA, IR, A1c, colesterol total, triglicéridos, LDLc, C3, hsCRP y RBP4 y significativamente menores de HDLc, comparado con el grupo control, se estudió la asociación de estos parámetros con la presencia de PDs.

Los resultados muestran como las pacientes que presentaron algún tipo de PDs presentaron una alteración del perfil lipídico, con un aumento del triglicéridos (con PDs=95,2 mg/dL, sin PDs=73,3 mg/dL, t de Student p=0,019) y disminución del HDLc (con PDs=56,0 mg/dL, sin PDs=64,2 mg/dL, t de Student p=0,001) y una media mayor de C3 (con PDs =122,6 mg/dL, sin PDs =112,5 mg/dL, t de Student p=0,022), insulina (con PDs =10,1 mUI/mL, sin PDs =7,86 mUI/mL t de Student p=0,021) y HOMA (con PDs=2,22, sin PDs =1,74, t de Student p=0,046).

La IR (teniendo en cuenta un valor HOMA \geq 3) fue detectada solo en el grupo PCOS, siendo esta asociación estadísticamente significativa. La presencia de IR mostró una asociación significativa con la media de PPD, BOP y en n.º de dientes con bolsas periodontales. Aquellas pacientes que presentaron IR, mostraron una mayor media de dichos parámetros de forma estadísticamente significativa frente a las que no presentaron IR, tras aplicar la prueba U de Mann Whitney para muestras independientes. Estos hallazgos nos muestran como la IR se asoció a un empeoramiento de los parámetros periodontales, pero no se encontró asociación significativa entre la presencia de IR y la presencia de PDs, tras aplicar el test de chi² (p=0,135). La media de LDLc, A1c, hsCRP, RBP4 y colesterol total no presentó diferencias agrupando a la muestra según la presencia/ausencia de PDs.

Correlaciones bivariadas entre las variables bioquímicas (que mostraron asociación significativa con la presencia de PDs) y las variables periodontales

Teniendo en cuenta a la muestra en su conjunto, el BOP se correlacionó positivamente con la insulina, HOMA, triglicéridos y C3. Sin embargo, con el HDLc se encontró una correlación negativa, es decir, valores mayores de BOP, se correlacionaron con menores valores de HDLc. El CAL se correlacionó positivamente con la insulina y el HOMA, y negativamente con el HDLc. La variable PPD y número de dientes con bolsas (PPD \geq 4 mm) se correlacionaron positivamente con la insulina y el HOMA. Además, la presencia de bolsas periodontales (PPD \geq 4 mm) se correlacionó con los triglicéridos y C3 de forma positiva, y con el HDLc de forma negativa. En número de dientes con CAL \geq 4 mm no mostró correlaciones significativas con ninguno de los parámetros bioquímicos asociados a la presencia de PDs (tabla 13). Podemos observar como la mayoría de las correlaciones encontradas en la muestra en su conjunto se observan también en el grupo PCOS y no así en el grupo control.

Para detectar otras posibles asociaciones, se realizaron correlaciones bivariadas entre las restantes determinaciones bioquímicas que mostraron diferencias entre PCOS y controles pero, que no se asociaron a la presencia de PDs (LDLc, A1c, CRPus, RBP4 y colesterol total) y los parámetros periodontales, sin encontrarse resultados significativos.

Tabla 13. Correlaciones bivariadas de Spearman entre las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs y los parámetros periodontales.

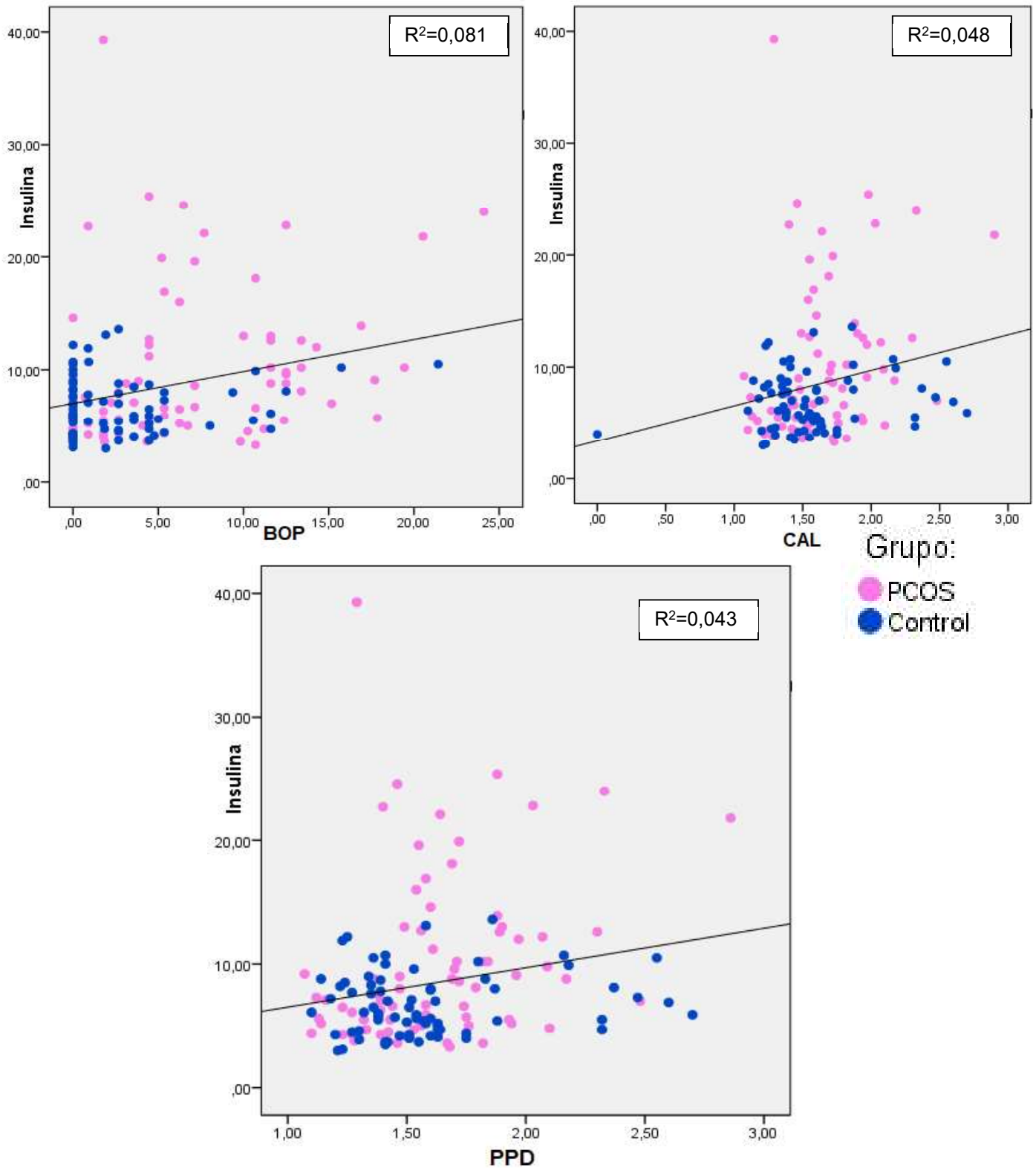
Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
Insulina					
P. total	0,302***	0,268***	0,250**	0,236**	0,039
Controles	0,031	0,061	0,033	-0,095	-0,117
PCOS	0,357**	0,345**	0,346**	0,224	-0,019
HOMA					
P. total	0,294***	0,255**	0,226**	0,206*	0,040
Controles	0,045	0,078	0,047	0,117	-0,145
PCOS	0,337**	0,320**	0,312**	0,186	-0,015

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
Triglicéridos					
P. total	0,203*	0,150	0,147	0,189*	0,072
Controles	0,114	0,090	0,126	0,106	-0,046
PCOS	0,123	0,149	0,123	0,181	0,017
HDLc					
P. total	-0,240***	-0,174*	-0,155	-0,239**	-0,054
Controles	-0,070	-0,188	-0,186	0,045	-0,017
PCOS	-0,209	-0,099	-0,076	-0,066*	-0,004
C3					
P. total	0,181*	0,111	0,100	0,215*	0,051
Controles	-0,064	-0,042	-0,013	0,073	0,040
PCOS	0,020	0,068	0,052	0,124	-0,014

Se realizaron las correlaciones de Pearson para las variables paramétricas y las correlaciones de Spearman para las no paramétricas. BOP: porcentaje de sangrado al sondaje; C3: complemento 3; CAL: nivel de inserción clínica; HDLc: colesterol de alta densidad, HOMA: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; N.º d. PPD+: número de dientes con bolsas periodontales ≥ 4 mm; PPD: profundidad de sondaje; P. total: población total del estudio; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL ≥ 4 mm; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

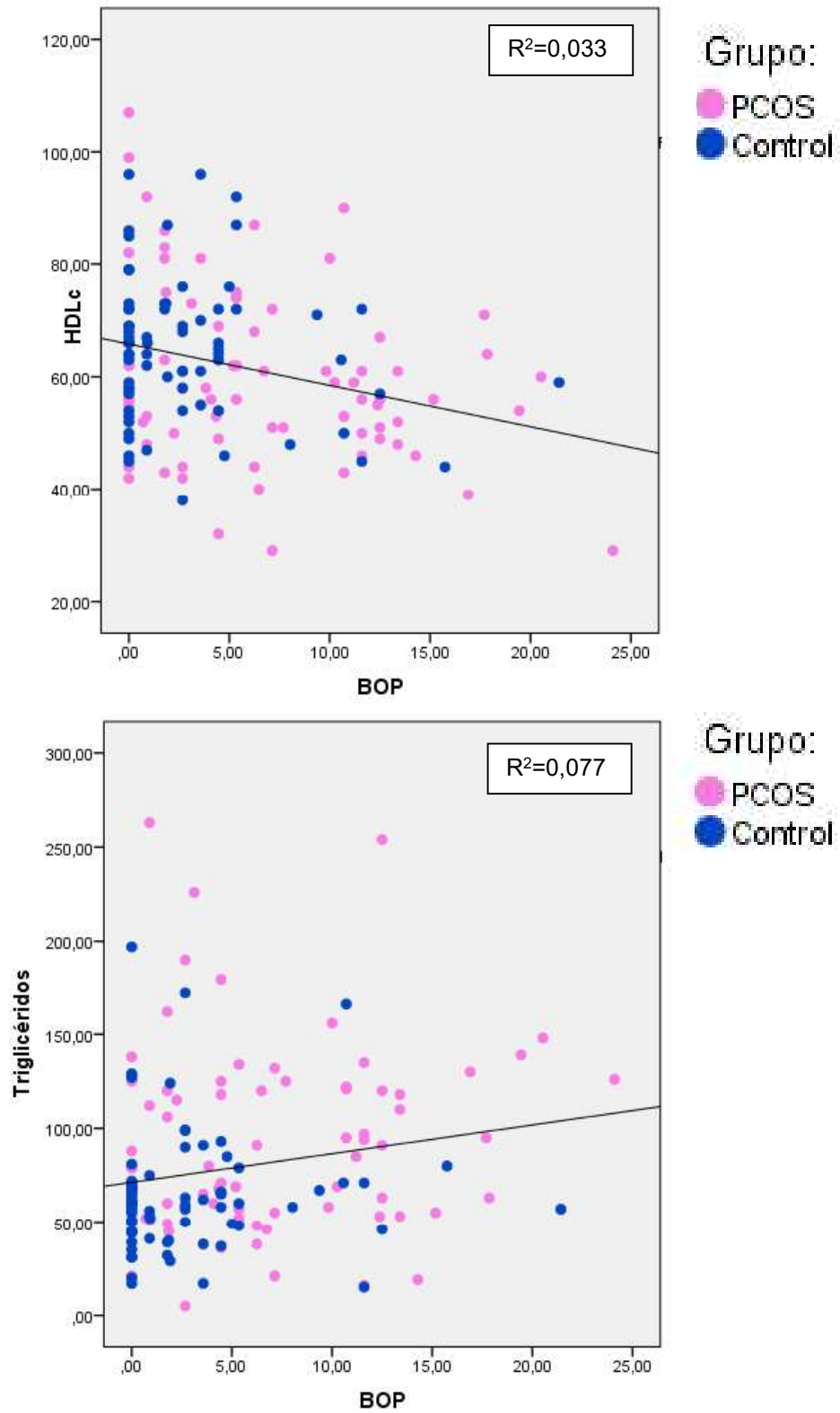
Para ver la influencia de las variables bioquímicas sobre el estado periodontal se realizaron regresiones lineales simples, siendo la variable dependiente cada uno de los parámetros periodontales y las independientes las variables bioquímicas insulina, HOMA, HDLc y triglicéridos (figura 15 y 16), que mostraron diferencias significativas entre los grupos, y una asociación significativa con la presencia de PDs y también con los parámetros periodontales. La insulina mostró una regresión lineal significativa con el BOP ($p=0,001$), CAL ($p=0,08$) y PPD ($p=0,013$) (figura 15). Estos resultados también ocurrieron con el HOMA, siendo una variable que mostró colinealidad con la insulina. Los triglicéridos ($p=0,028$) y el HDLc ($p=0,001$) también mostraron una regresión lineal significativa con el BOP (figura 16).

Figura 15. Regresiones lineales siendo la variable dependiente cada parámetro periodontal y la independiente la insulina.



BOP: sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica; PPD: profundidad de sondaje.

Figura 16. Regresiones lineales siendo la variable dependiente el BOP y la independiente los triglicéridos y el HDLc.



BOP: sangrado al sondaje; HDLc: colesterol de alta densidad.

Antes de realizar el modelo logístico para conocer la probabilidad del grupo PCOS a presentar alteraciones bioquímicas, realizamos correlaciones bivariadas entre dichos parámetros. Se obtuvo colinealidad entre la insulina, HOMA, colesterol total, HDLc, LDLc y triglicéridos, mostrando como dichos parámetros están estrechamente relacionados y se comportan de manera similar. Por ello, en el modelo logístico binario, fue introducido la insulina con C3, hsCRP y RBP4 (que no mostraron colinealidad). El resultado del modelo logístico, nos muestra como las pacientes con PCOS tiene un 9% más de probabilidad de presentar un promedio mayor de insulina, un 3% más de probabilidad de presentar un promedio mayor de C3, comparado las controles. Además, se encontró una probabilidad 2,61 veces mayor de presentar un promedio mayor de RBP4 en pacientes con PCOS comparado con las controles (tabla 14).

Tabla 14. Modelo de regresión logística binaria introduciendo como variable dependiente el grupo PCOS y como independientes las variables bioquímicas que mostraron diferencias significativas entre los grupos.

.Variables de la ecuación (modelo $p=0,000$)**						
	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%	
Insulina	0,093	1	0,045*	1,09	1,00 – 1,20	
hsCRP	-0,038	1	0,103	0,963	0,919 – 1,00	
C3	-0,032	1	0,005**	1,03	1,01 – 1,05	
RBP4	0,960	1	0,017*	2,61	1,18 – 5,75	
constante	-6,191	1	0,000***	0,002		

Modelo de regresión logística binaria por el método entrar. B: coeficiente de la variable; BMI: índice de masa corporal; C3: complemento 3; Exp (B): exponente B equivalente al valor de OR; gl: grados de libertad; hsCRP: proteína C reactiva ultrasensible; RBP4: proteína fijadora de retinol A. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$.

Para determinar la importancia de padecer PCOS y tener alteraciones bioquímicas ante el desarrollo de PDs realizamos un modelo logístico. Introducimos en el modelo predictivo las variables bioquímicas que se han correlacionado de forma significativa con la presencia de PDs y que mostraron diferencias significativas entre el grupo PCOS y control.

Obtuvimos un modelo significativo, siendo significativas en el modelo el grupo PCOS y el HDLc. Al interpretar esta regresión vemos como el pertenecer al grupo control y tener un promedio mayor de HDLc sería un factor protector ante la presencia de PDs (tabla 15).

Tabla 15. Modelo regresión logística binaria, siendo la variable dependiente presencia/ausencia de PDs y las variables independientes los parámetros bioquímicos y el grupo.

Variables de la ecuación (modelo p=0,000)**					
	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
Grupo	-1,54	1	0,001**	0,214	0,083 – 0,552
Insulina	-0,028	1	0,527	0,972	0,892 – 1,06
Triglicéridos	0,007	1	0,180	1,00	0,997 – 1,01
C3	-0,004	1	0,632	0,996	0,980 – 1,01
HDLc	-0,039	1	0,027*	0,962	0,930 – 0,996
constante	3,55		0,039*	35,1	

Modelo logístico con el método de entrar, introduciendo como variable dependiente la presencia de PDs y como independientes el grupo, la insulina, el C3, triglicéridos y el HDLc. Se estableció el nivel de significación con un valor de $p < 0,05$. C3: complemento 3, Exp (B): exponente B equivalente al valor de OR; C3: complemento 3; HDLc: colesterol de alta densidad; gl: grados de libertad; IC95: intervalo de confianza para el 95% del valor de OR. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

4.3 Asociación de hormonas sexuales, el estado periodontal y el grupo

El grupo PCOS mostró valores significativamente menores de estradiol y 17-OH progesterona (tabla 5), sin embargo, estas hormonas no mostraron asociación significativa con la presencia de PDs tras realizar la prueba U de Mann Whitney. El rango promedio de estradiol en el grupo que mostró PDs fue 64,4 pg/mL y en el grupo que no mostró PDs fue 66,3 pg/mL (U de Mann Whitney $p = 0,825$). Con respecto a la 17-OH progesterona, el valor promedio fue algo mayor en el grupo de pacientes periodontalmente sanas (4,85 pg/dL frente a 1,18 pg/dL) pero sin diferencias estadísticamente significativas (U de Mann Whitney $p = 0,251$).

Correlaciones bivariadas de las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre el grupo PCOS y control, con las variables periodontales

Tras realizar correlaciones bivariadas de Spearman entre el estradiol y cada uno de los parámetros periodontales no se obtuvo ninguna correlación estadísticamente significativa. De igual manera, tras realizar correlaciones bivariadas entre la 17OH-progesterona y cada uno de los parámetros periodontales no se obtuvo ninguna correlación significativa (tabla 16).

Tabla 16. Correlaciones bivariadas de Spearman entre el estradiol y la 17OH-progesterona con los parámetros periodontales.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
Estradiol					
P. total	0,021	0,038	0,026	-0,033	-0,002
Controles	0,058	-0,032	0,037	-0,117	-0,098
PCOS	0,215	0,099	0,091	0,110	0,146
17 Hidroxiprogesterona					
P. total	-0,074	-0,049	-0,023	-0,052	-0,010
Controles	0,097	-0,005	0,021	-0,085	-0,015
PCOS	0,044	0,050	0,078	0,045	0,107

BOP: porcentaje de sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica; N.º d. PPD+: número de dientes con bolsas periodontales ≥ 4 mm; PPD: profundidad de sondaje; P. total: población total del estudio; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL ≥ 4 mm.

Debido a las alteraciones hormonales presentes en el PCOS, quisimos determinar la probabilidad de las pacientes PCOS de presentar alteraciones del estradiol y 17OH-progesterona. Para conocer dicha probabilidad, realizamos un modelo logístico incluyendo el estradiol y la 17-OH progesterona como variables independientes, siendo la variable dependiente el grupo PCOS. En este modelo logístico se obtuvo una asociación significativa entre el grupo PCOS y el estradiol, mientras que la 17-OH progesterona no mostró asociación con el grupo (tabla 17).

Tabla 17. Regresión logística binaria con el grupo PCOS como variable dependiente y como variables independientes el estradiol y la 17-OH progesterona.

Variables de la ecuación (modelo $p=0,000$)**					
	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
Estradiol	0,010	1	0,002**	1,010	1,00 – 1,01
17OH	-0,011	1	0,428	0,989	0,963 – 1,01
constante	-0,718	1	0,07	0,488	

Modelo logístico binario aplicando el método de entrar. Exp (B): exponente B equivalente al valor de OR; gl: grados de libertad; IC95: intervalo de confianza para el 95% del valor de OR; 17OH: 17 hidroxiprogesterona. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Árbol de clasificación CHAID

Tras haber analizado todos los parámetros antropométricos, bioquímicos y hormonas sexuales, hemos realizado los análisis de clasificación CRT, CHAID y CHAID exhaustivo. Se obtuvo un árbol de clasificación CHAID exhaustivo que detectó como variable significativa en la clasificación automática la insulina. La clasificación nos muestra como valores $\geq 7 \mu\text{UI/mL}$ de insulina, se corresponden con una mayor prevalencia de PDs de forma estadísticamente significativa (figura 17).

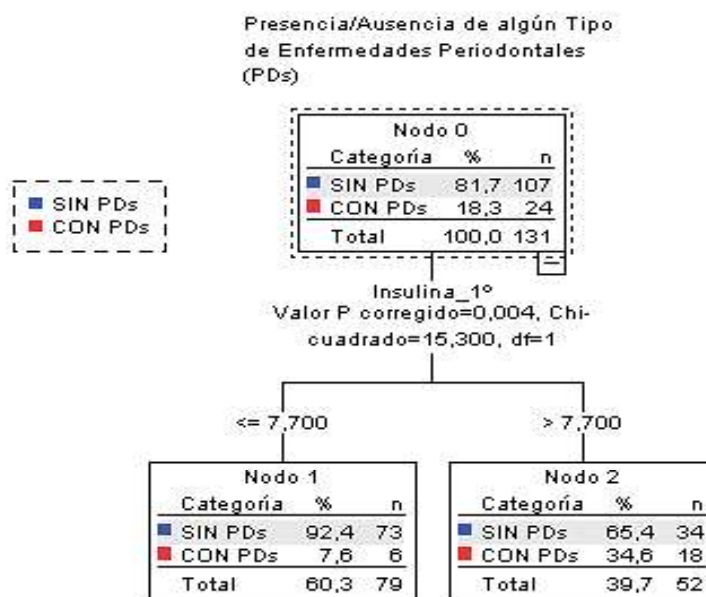


Figura 17. Árbol de clasificación CHAID exhaustivo.

Objetivo 5

Características de la subpoblación

Para analizar el perfil inflamatorio se estudió una subpoblación de tres grupos categorizados como: pacientes PCOS sin ninguna PDs (n=25), pacientes PCOS con gingivitis (n=24) y pacientes controles sin PDs (n=50). Esta subpoblación se reclutó entre la población general con el objetivo de cumplir el principio de comparabilidad de forma que la muestra fue equilibrada, sin mostrar diferencias significativas entre el BMI de los 3 grupos, para poder estudiar el perfil inflamatorio y el riesgo cardiovascular. De igual manera, no hubo diferencias en el nivel de formación, la ocupación, los hábitos de higiene oral, tabaco y alcohol entre los tres grupos.

Toma de medicación

El grupo control se diferenció de los grupos PCOS (periodontalmente sanas y con gingivitis) en la toma de OC, sin embargo, en cuanto a la toma de metformina, las diferencias se encontraron entre las pacientes del grupo PCOS periodontalmente sanas y los restantes dos grupos (tabla 18).

Parámetros bioquímicos

Al analizar las diferencias entre las variables bioquímicas, el grupo PCOS, PCOS con gingivitis y el grupo control, se encontraron diferencias significativas entre los valores promedio de insulina; HOMA, colesterol total, HDLc, LDLc, triglicéridos, C3, RBP4 y hsCRP (tabla 18). La presencia de gingivitis en el grupo PCOS, ha mostrado una media significativamente mayor de insulina, colesterol total, LDLc, triglicéridos y hsCRP. Sin embargo, el valor de HDLc fue significativamente menor en las PCOS con gingivitis comparado con las PCOS sanas y las controles. Los valores de RBP4 mostraron las diferencias entre el grupo PCOS frente el grupo control (prueba post hoc de Bonferroni $p < 0,001$) y entre el grupo control con el grupo PCOS gingivitis (prueba post hoc Bonferroni $p = 0,032$). De igual manera ocurrió con el valor de C3, las diferencias se encontraron entre las controles frente al grupo PCOS (post hoc Bonferroni $p < 0,001$) y de las controles frente al grupo PCOS gingivitis (post hoc Bonferroni $p = 0,003$).

Hormonas sexuales

Se encontró una media significativamente menor de estradiol en las PCOS y en las PCOS con gingivitis (tabla 18). Para analizar donde se encontraron estas diferencias realizamos la prueba post hoc de Bonferroni y vemos como las diferencias se encuentran entre el grupo PCOS y el grupo control ($p=0,005$), sin haber diferencias entre los demás grupos. Al mismo tiempo, observamos que la media de 17OH-progesterona presenta valores significativamente menores en el grupo PCOS con gingivitis al compararlo con las PCOS periodontalmente sanas y las controles.

Tabla 18. Estadística descriptiva de la subpoblación diferenciando la muestra en 3 grupos: PCOS, PCOS con gingivitis y controles (sin ningún tipo de PDs).

Parámetros	CONTROL (50)	PCOS (n=25)	PCOS+ (n=24)
Medicación			
OC: Si toma % (n)	14,0 (7)a	44 (11)b	54,1 (13)b**
Metformina: Si toma % (n)	0***a	44(11)b	0 (0)a***
Bioquímicos			
Glucosa (mg/dL)	85,7 ± 8,51	85,4 ± 14,8	88,8 ± 7,13
Insulina (µUI/mL)	6,62 ± 2,55a	9,64 ± 7,78 b	10,7 ± 5,20b**
HOMA	1,40 ± 0,585a	2,22 ± 2,14b	2,37 ± 1,27b**
A1c (%)	5,04 ± 0,251	5,17 ± 0,282	5,06 ± 0,295
Colesterol (mg/dL)	176,0 (155,0, 192,0)a	189,5 (155,0, 192,0)b	188,5 (168,5, 214,7)ab*
HDLc (mg/dL)	65,5 ± 12,4a	62,4 ± 17,4ab	56,3 ± 12,6b**
LDLc (mg/dL)	99,4 ± 25,5a	110,4 ± 34,8ab	118,5 ± 25,4b*
Triglicéridos (mg/dL)	64,1 ± 32,4a	86,4 ± 52,3b	98,2 ± 49,5b**
hsCRP (mg/L)	0,730 (0,320, 2,63)a	4,14 (0,652, 6,89)b	3,52 (1,18, 8,00)b***
Fibrinógeno (mg/dL)	401,3 ± 80,8	427,2 ± 104,4	404,5 ± 123,5
C3 (mg/dL)	103,4 ± 17,5***a	125,7 ± 38,2b	124,5 (±19,8)b***
Homocisteína (µmol/L)	9,62 ± 2,31	10,4 ± 9,11	9,78 (±2,84)
RBP4 (mg/dL)	1,80 ± 0,448***a	2,22 ± 0,597b	2,12 (±0,456)b***
Hormonas sexuales			
FSH (mUI/dL)	4,60 (2,50, 5,77)	4,00 (2,60, 5,00)	4,00 (1,85, 5,37)
LH (mUI/dL)	3,60 (2,42, 5,60)	3,80 (2,80, 5,80)	3,70 (0,550, 6,12)
Estradiol (pg/mL)	41,5 (12,2, 84,5)a	52,0 (21,0, 140,0)b	32,5 (10,0, 53,0)ab**
Testosterona (ng/dL)	0,406 ± 0,203	0,437 ± 0,189	0,400 ± 0,128
Androstendiona(ng/mL)	3,18 ± 1,18	4,24 ± 6,01	3,15 ± 1,36
DEAHS (µg/dL)	218,9 ± 353,5	284,8 ± 128,1	283,2 ± 132,7
17OH (ng/dL)	1,23 (0,78, 2,20)a	0,77 (0,53, 1,07)b	0,85 (0,57, 1,72)ab**
SHBG (µg/dL)	73,0 (75,0, 93,0)	96,0 (39,2, 275,2)	87,0 (40,7, 182,5)
IAL (%)	1,92 ± 1,08	2,21 ± 2,22	2,71 ± 2,63
Prolactina (ng/dL).	21,2 ± 10,3	19,3 ± 11,1	23,7 ± 11,0

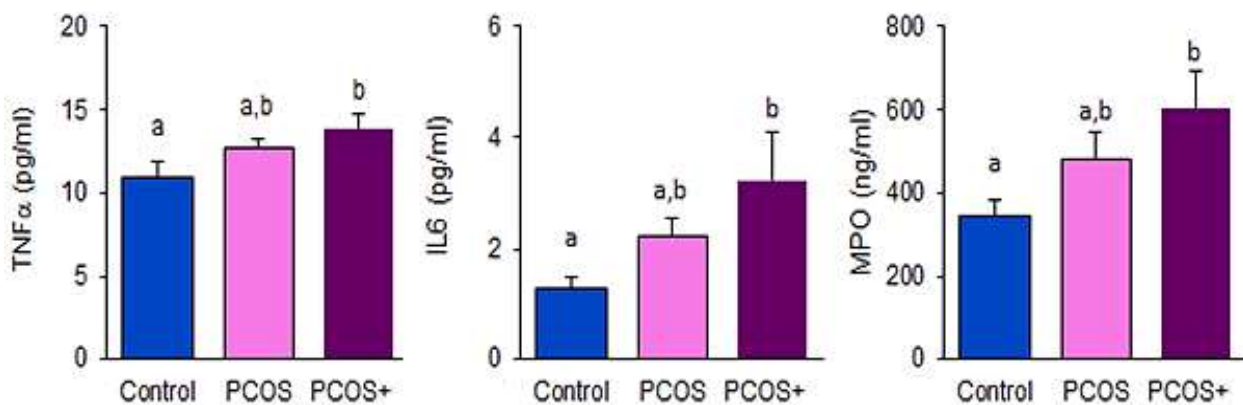
Parámetros	CONTROL (50)	PCOS (n=25)	PCOS+ (n=24)
Periodontograma			
PPD (mm)	1,53 (1,36, 1,82)	1,49 (1,31, 1,71)	1,60 (1,49, 1,83)
CAL (mm)	1,53 (1,36, 1,84)	1,49 (1,31, 1,72)	1,63 (1,46, 1,83)
BOP (%)	0,890 (0,000, 3,57)a	2,89 (0,890, 5,35)a	12,5 (11,4, 14,7)b***
Pérdida ósea (%)	0,952 ± 4,56	2,14 ± 7,21	2,14 ± 7,99
Índice de Placa	0,737 ± 0,350 a	0,598 ± 0,471 b	0,869 ± 0,580 c*
Índice de Cálculo	0,019 ± 0,052 a	0,022 ± 0,066 b	0,165 ± 0,426 c*
N.º ausencias dentales	0,32 ± 1,37	0,68 ± 1,39	0,44 ± 1,04
N.º de dientes PPD+	0,130 ± 0,495 a	0,300 ± 1,00 a	0,600 ± 0,957 b*
N.º de dientes CAL+	0,020 ± 0,127	0,320 ± 1,05	0,320 ± 1,40
Tratamiento Periodontal			
Nunca % (n)	30,0 (15)	40 (10)	14,2 (11)
Tartrectomía % (n)	70,0 (35)	48 (12)	45,8 (11)
SRP % (n)	0,00 (0)a	12 (3)b	8,33 (2)b*

Los datos se expresan como media ± SD para variables paramétricas y como mediana e intercuartiles 25 y 75 para variables no paramétricas. Se utilizó un ANOVA de una vía (test de Kruskal Wallis para no paramétricas) y el test χ^2 para proporciones. Los resultados del análisis post hoc de Bonferroni se indican por medio de subíndices (a, b, c) donde diferentes subíndices indican diferencias significativas entre las determinaciones. A1c%: porcentaje de hemoglobina glicosilada; BOP: sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica; CAL+: nivel de inserción clínica ≥ 4 mm; C3: complemento 3; DEAHS: dehidroepiandrosterona sulfato; FSH: folículo estimulante; HDLc: colesterol de alta densidad; HOMA modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; hsCRP: proteína C reactiva ultrasensible; IAL: índice de androgénico libre en porcentaje LDLc: colesterol de baja densidad; LH: luteinizante 17OH: 17 hidroxiprogesterona; ; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; PPD: profundidad de sondaje; PPD+: profundidad de sondaje ≥ 4 mm; RBP4: proteína fijadora de retinol A ; SHBG: globulina fijadora de hormonas sexuales; SRP: raspado y alisado radicular. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

5.1 Cuantificación sistémica de proteínas proinflamatorias: MPO, IL6 y TNF α

Los niveles séricos de las proteínas inflamatorias, se cuantificaron con Luminex® y fueron significativamente más altas en el grupo PCOS con gingivitis tras aplicar el test ANOVA. Las diferencias se encontraron entre el grupo control con el grupo PCOS con gingivitis, mientras que, aunque los niveles de TNF α , IL6 y MPO fueron mayores en el grupo PCOS con gingivitis, no mostraron diferencias con el grupo PCOS periodontalmente sanas (figura 18).

Figura 18. Valores promedio de TNF α , IL6 y MPO en el grupo control, PCOS periodontalmente sanas y PCOS con gingivitis.



Los datos se representan como media + error estándar. Los grupos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con un análisis post hoc de Bonferroni. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las medias. IL6: interleuquina 6, MPO: mieloperoxidasa; PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

Asociación entre la toma de medicación y los marcadores inflamatorios

Para conocer si la toma de OC tuvo alguna influencia sobre los resultados del perfil inflamatorio obtenidos con Luminex se realizó la prueba T de Student para muestras independientes, en base a la toma de OC. Ninguna de las proteínas cuantificadas mostró diferencias significativas en los valores promedios, teniendo en cuenta la toma/no toma de OC. La toma de metformina tampoco mostró cambios significativos en los resultados obtenidos con el Luminex®.

Asociación entre proteínas inflamatorias, los parámetros periodontales y la presencia de gingivitis

Correlaciones bivariadas entre los parámetros inflamatorios y los parámetros periodontales

Los parámetros periodontales PPD y CAL se correlacionaron positivamente con el TNF α , teniendo en cuenta a la submuestra en su conjunto. Por otro lado, en el grupo PCOS se encontró una correlación positiva significativa entre el CAL y la MPO. El número de dientes con bolsas periodontales (PPD \geq 4 mm) no se correlacionó estadísticamente con ninguna de las proteínas inflamatorias, mientras que el número de dientes con CAL \geq 4 mm se correlacionó significativamente con la IL6 de forma positiva en el grupo PCOS (tabla 19).

Tabla 19. Correlaciones bivariadas de Spearman entre los parámetros periodontales, las proteínas inflamatorias y MPO.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
TNFα					
P. total	0,117	0,264*	0,255*	-0,009	0,091
Controles	0,190	0,368	0,382	0,047	---
PCOS	-0,146	0,156	0,163	-0,024	0,166
PCOS+	0,255	0,045	-0,012	-0,080	0,019
IL6					
P. total	0,123	-0,241	-0,180	-0,107	0,292**
Controles	-0,196	-0,241	-0,234	-0,122	---
PCOS	0,223	-0,308	-0,328	-0,044	0,749***
PCOS+	0,281	-0,042	-0,007	-0,286	-0,149
MPO					
P. total	0,066	0,221	-0,177	-0,222	-0,023
Controles	-0,048	-0,034	-0,031	-0,195	---
PCOS	0,051	0,391*	0,372	-0,155	0,158
PCOS+	0,144	0,238	0,199	-0,409	-0,155

Se realizaron correlaciones bivariadas de Spearman para los datos no paramétricos y de Pearson para los datos paramétricos. BOP: sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica; IL6: interleuquina 6; MPO: mieloperoxidasa; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL \geq 4 mm; N.º d. PPD+: número de dientes con PPD \geq 4 mm; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; PPD: profundidad de sondaje. *p<0,05, **p<0,01 ***p<0,001, --- valores no cuantificables.

En cuanto al estado periodontal, se calcularon los valores promedio de cada una de las proteínas inflamatorias, diferenciando a los pacientes por las presencias de gingivitis o por ser periodontalmente sanas, realizándose la prueba T de Student para muestras independientes. La presencia de gingivitis no se asoció a un aumento de las proteínas proinflamatorias; los valores promedio de TNF α , IL6 y MPO fueron similares entre las pacientes con gingivitis y periodontalmente sanas (tabla 20).

Tabla 20. Valores promedio de proteínas inflamatorias según la presencia/ausencia de gingivitis.

Parámetros	Sano	Gingivitis
TNFα (pg/mL)	12,9 \pm 5,54	13,7 \pm 6,08
IL6 (pg/mL)	7,37 \pm 19,8	8,28 \pm 13,8
MPO (ng/mL)	482,5 \pm 334,5	622,7 \pm 543,4

Los datos son expresados con las medias \pm SD, se realizó T de Student para muestras independientes. IL6: interleuquina 6; MPO: mieloperoxidasa; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

Una vez que determinamos que existió un promedio mayor de marcadores inflamatorios en el grupo PCOS con gingivitis, quisimos determinar la influencia de estos marcadores sobre el estado periodontal; concretamente sobre la inflamación (BOP) y la inserción (PPD y CAL). Para ello, realizamos regresiones lineales simples entre los parámetros periodontales y los marcadores inflamatorios. Las regresiones lineales fueron significativas, de forma que el CAL mostró una regresión lineal simple estadísticamente significativa con el TNF α y la MPO, y la PPD mostró una regresión lineal simple significativa con el TNF α . De esta forma, podemos observar como la presencia de valores promedios mayores de TNF α y MPO, podrían explicar en un 5-8% una menor inserción periodontal (CAL y PPD) (tabla 21).

Tabla 21. Regresiones lineales simples introduciendo como la variable dependiente cada uno de los parámetros periodontales (que se correlacionaron con alguna de las proteínas inflamatorias) y como variables independientes las proteínas que se correlacionaron de forma estadísticamente significativa.

Parámetros	B	R	R ²	R ² ajustado	Sig.
CAL					
TNF α	0,020	0,284	0,081	0,068	0,014*
Constante	1,31				0,000***
MPO	0,000	0,289	0,084	0,071	0,012*
Constante	1,43				0,000***
PPD					
TNF α	0,014	0,226	0,051	0,038	0,050*
Constante	1,42				0,000***

Modelo de regresión lineal simple con el método de entrar. B: coeficiente de la regresión para la variable; BOP: sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica; MPO: mieloperoxidasa; PPD: profundidad de sondaje; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. *p<0,05; ***p<0,001.

Una vez analizados los valores promedios de marcadores inflamatorios, realizamos un modelo logístico multinomial para determinar la probabilidad de presentar valores mayores de proteínas proinflamatorias, diferenciando a la muestra en los 3 grupos (control, PCOS periodontalmente sanas y PCOS con gingivitis) siendo la categoría de referencia en grupo control (tabla 22). No se encontró un modelo significativo, ni tampoco ninguna de las variables obtuvo asociación significativa en el multinomial con el grupo. Se realizaron modelos con los efectos principales, factoriales y covariables y no se encontraron valores estadísticamente significativos.

Tabla 22. Modelo de regresión multinominal siendo la variable dependiente el grupo y las independientes las proteínas inflamatorias.

Variables de la ecuación (modelo p=0,892) Cox y Snell =0,039						
Grupo 3 categorías politémica		B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
PCOS	Intersección	-0,172	1	0,838		
	TNF α	0,043	1	0,441	1,044	0,935 – 1,16
	IL6	-0,002	1	0,920	0,998	0,965 – 1,03
	MPO	-0,001	1	0,352	0,999	0,998 – 1,00
PCOS+	Intersección	-0,629	1	0,492		
	TNF α	0,013	1	0,837	1,013	0,897 – 1,14
	IL6	0,002	1	0,916	1,002	0,697 – 1,03
	MPO	0,000	1	0,677	1,000	0,999 – 1,00

El valor de Cox y Snell corresponde al valor de la pseudo R². Se estableció el nivel de significación con un valor de p<0,05. Exp (B): exponente B equivalente al valor de OR; gl: grados de libertad; IC95: intervalo de confianza para el 95% del valor de OR; IL6: interleuquina 6; MPO: mieloperoxidasa; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. *p<0,05.

Asociación entre proteínas inflamatorias y los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo

Parámetros bioquímicos

Para estudiar la asociación entre los parámetros bioquímicos y las proteínas inflamatorias, se realizaron correlaciones bivariadas entre cada uno de ellos. En la tabla 23 se muestran las correlaciones de las variables bioquímicas que se relacionaron con la presencia del PDs, y en la tabla 24 se muestran las correlaciones con variables bioquímicas que se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con alguna de las proteínas proinflamatorias, pero que no se asociaron a la presencia de PDs. Las demás correlaciones entre cada parámetro bioquímico y los parámetros inflamatorios no mostraron correlaciones significativas.

Correlaciones bivariadas entre los parámetros bioquímicos con los parámetros inflamatorios obtenidos en el Luminex®

Se obtuvo una correlación significativa positiva entre el TNF α y la insulina, HOMA, triglicéridos y C3. Estas correlaciones fueron significativamente mayores

en el grupo PCOS con gingivitis. La MPO se correlacionó con la insulina y el HOMA en las pacientes PCOS periodontalmente sanas, y la IL6 no mostró correlaciones estadísticamente significativas (tabla 23).

Tabla 23. Correlaciones bivariadas entre los parámetros inflamatorios y las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs (que mostraron diferencias significativas entre los grupos).

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	Insulina	HOMA	Triglicéridos	HDLc	C3
TNFα					
P. total	0,273**	0,211	0,329*	-0,038	0,308**
Controles	-0,046	-0,153	0,283	0,326	-0,075
PCOS	0,222	0,153	0,352	-0,116	0,384
PCOS+	0,558*	0,532*	0,343	-0,273	0,459*
IL6					
P. total	0,023	0,021	-0,136	-0,069	-0,092
Controles	0,232	0,226	-0,225	-0,358	-0,102
PCOS	0,048	0,043	-0,103	0,092	-0,100
PCOS+	-0,252	-0,244	-0,253	0,013	-0,161
MPO					
P. total	0,227	0,200	-0,051	-0,190	0,043
Controles	0,204	0,183	-0,241	-0,261	0,213
PCOS	0,432*	0,418*	0,074	-0,070	-0,207
PCOS+	0,025	-0,030	-0,229	-0,153	0,137

Correlaciones bivariadas de Pearson. C3: complemento 3; HDLc: colesterol de alta densidad; HOMA: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; IL6: interleuquina 6; MPO: mieloperoxidasa; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. *p<0,05; **p<0,01.

Para conocer si existió alguna asociación entre los restantes parámetros bioquímicos que mostraron diferencias significativas entre los grupos, pero que no se asociaron a la prevalencia de PDs, con las proteínas inflamatorias, realizamos correlaciones bivariadas entre ellos. El TNF α mostró una correlación con los niveles de RBP4, en los grupos PCOS (con y sin gingivitis) y en la población total, pero no se encontró esta correlación analizando los controles. De igual manera, la IL6 mostró una correlación con los valores de A1c y colesterol total en la población total (tabla 24).

Tabla 24. Correlaciones significativas entre las variables bioquímicas no asociadas a la presencia de PDs, pero que mostraron correlaciones significativas con algunas de las proteínas inflamatorias.

Parámetros	Coeficiente de correlación			
	P. TOTAL	CONTROL	PCOS	PCOS+
TNFα				
RBP4	0,430***	0,091	0,482*	0,427*
IL6				
A1c	-0,310*	-0,721	-0,224	-0,162
Colesterol	-0,295*	-0,231	-0,564**	-0,309

A1c: hemoglobina glicosilada; IL6: interleuquina 6; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; P. TOTAL: población total; RBP4: proteína fijadora de retinol A; Sig: significación estadística correspondiente al valor de p; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Hormonas sexuales

Para estudiar la asociación entre las hormonas sexuales (que mostraron diferencias entre los grupos) y las proteínas inflamatorias, se realizaron correlaciones bivariadas de Spearman entre cada uno de ellos. Ni el estradiol ni la 17OH-progesterona se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con las proteínas inflamatorias TNF α , la IL6 y MPO (tabla 25).

Además, se realizaron las correlaciones bivariadas entre las restantes hormonas sexuales y el TNF α , la IL6, MPO. Solo se encontró una correlación positiva (coeficiente de Spearman= 0,285) estadísticamente significativa (p=0,024) entre la DEHAS con el TNF α , teniendo en cuenta a la submuestra en su conjunto.

Tabla 25. Correlaciones bivariadas de Spearman entre las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre los grupos, los marcadores inflamatorios y la MPO.

Parámetros	Coeficiente de correlación	
	Estradiol	17 Hidroxiprogesterona
TNFα		
P. total	0,083	-0,181
Controles	0,110	-0,360
PCOS	0,210	0,182
PCOS+	0,031	-0,343
IL6		
P. total	0,067	0,172
Controles	0,371	0,087
PCOS	0,282	0,177
PCOS+	-0,268	0,453
MPO		
P. total	0,092	0,090
Controles	0,247	0,026
PCOS	0,020	0,262
PCOS+	0,024	-0,013

IL6: interleuquina 6; MPO: mieloperoxidasa; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa.

Dado que los marcadores inflamatorios se correlacionaron con algunos de los parámetros bioquímicos y hormonas sexuales, realizamos regresiones lineales para ver el porcentaje de influencia los marcadores inflamatorios sobre ellos.

El TNF α mostró regresiones lineales simples significativas con la insulina, el HOMA, los triglicéridos, C3, y la RBP4, siendo el valor de la regresión mayor con la RBP4 (tabla 26). La IL6 y la MPO no mostraron regresiones estadísticamente significativas con ninguna de las variables bioquímicas ni tampoco con las hormonas sexuales. La RBP4 fue la variable que obtuvo mayor porcentaje de influencia (11,7%) sobre el TNF α , seguida de los triglicéridos (9,6%), el C3 (8,2%) y la insulina (6,2%).

Tabla 26. Regresiones lineales siendo la variable dependiente cada proteína inflamatoria y la MPO y como las independientes los parámetros bioquímicos, con las que se obtuvo correlación estadísticamente significativa.

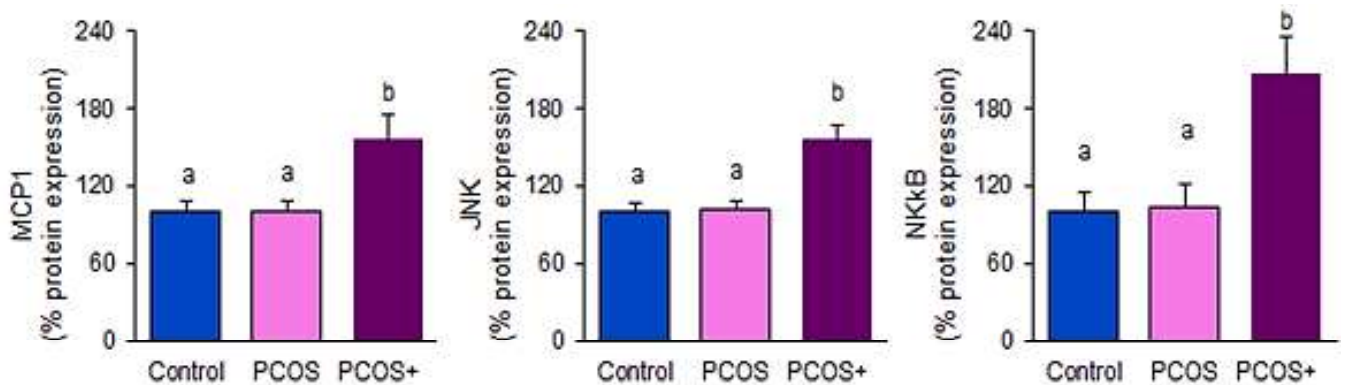
Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig.
TNFα					
Insulina	0,268	0,273	0,074	0,062	0,019*
Constante	10,8				0,000***
HOMA	0,745	0,211	0,045	0,031	0,071
Constante	11,7				0,000***
Triglicéridos	0,038	0,329	0,108	0,096	0,004**
Constante	10,1				0,000***
C3	0,066	0,308	0,095	0,082	0,008**
Constante	5,62				0,000***
RBP4	3,78	0,359	0,129	0,117	0,002**
Constante	5,62				0,022*
IL6					
A1c	-13,3	0,194	0,038	0,020	0,147
Constante	75,5				0,108
Colesterol	-0,073	0,138	0,019	0,002	0,300
Constante	21,3				0,116
MPO					
HOMA	51,1	0,200	0,040	0,027	0,088
Constante	428				0,000***

Regresiones lineales simples con el método de entrar. B: coeficiente de la regresión; C3: complemento 3; HOMA: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; IL6: interleuquina 6; RBP4: proteína fijadora de retinol A; TNF α : factor de necrosis tumoral alfa. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

5.2 Cuantificación de MCP1 y de las proteínas implicadas en la activación del inflammasoma NLRP3: JNK y NFκB (en monocitos y linfocitos)

Las proteínas inflamatorias que activan el inflammasoma NLRP3 cuantificadas mediante Western blot (JNK y NFκB) y la MCP1 (atrayente de leucocitos) resultaron significativamente más altas en el grupo PCOS con gingivitis tras aplicar el test ANOVA. Para conocer las diferencias entre los tres grupos, se realizaron las pruebas post hoc de Bonferroni, obteniéndose como resultado que las diferencias fueron entre el grupo PCOS con gingivitis, mientras que los valores promedio de las pacientes del grupo PCOS periodontalmente sanas y controles fueron similares (figura 19).

Figura 19. Valores promedio de MCP1, JNK y NFκB según el grupo.



Los datos se representan como media + error estándar. Los grupos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con un análisis post hoc de Bonferroni. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las medias. JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis.

Asociación entre las proteínas inflamatorias determinadas mediante Western blot y la toma de medicación

En cuanto a la toma de OC no se asoció a cambios en los niveles de MCP1, JNK ni tampoco con de NFκB tras aplicar el test T de Student para muestras independientes. Por otro lado, la toma de metformina se asoció a valores significativamente menores de NFκB tras aplicar el test T de Student.

Asociación entre las proteínas inflamatorias determinadas mediante Western blot, los parámetros periodontales, la presencia de gingivitis y el grupo

Correlaciones bivariadas entre los parámetros periodontales y los parámetros inflamatorios obtenidos en el Western blot

Tras realizar las correlaciones bivariadas entre las proteínas inflamatorias y cada uno de los parámetros periodontales, la MCP1, JNK y NFκB, obtuvieron correlaciones significativas positivas con el BOP. Valores mayores de BOP se correspondieron con valores mayores de MCP1, JNK y NFκB. Por otro lado, la variable CAL y PPD en el grupo PCOS con gingivitis mostró una correlación negativa con la JNK. El número de dientes con bolsas (PPD≥4 mm) se correspondió positivamente con la MCP1 sólo en el grupo PCOS con gingivitis y al igual que con el número de dientes con CAL≥4 mm (tabla 27).

Tabla 27. Correlaciones bivariadas entre las proteínas inflamatorias leucocitarias y los parámetros periodontales.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
MCP1					
P. total	0,273*	0,117	0,167	0,231	0,254
Controles	0,369	0,312	0,311	-0,063	---
PCOS	-0,416*	0,023	0,000	-0,176	0,030
PCOS+	-0,188	-0,244	-0,173	0,451**	0,406**
JNK					
P. total	0,360**	0,017	0,050	0,120	0,141
Controles	-0,147	0,210	0,216	0,090	---
PCOS	0,083	0,208	0,204	-0,115	0,089
PCOS+	0,084	-0,436*	-0,428*	0,095	0,169
NFκB					
P. total	0,280*	0,053	0,055	0,018	-0,164
Controles	-0,294	0,329	0,317	-0,157	---
PCOS	0,087	0,059	0,037	-0,129	-0,129
PCOS+	0,284	-0,238	-0,231	0,027	0-,299

Se realizaron las bivariadas de Spearman datos no paramétricos y las de Pearson para los datos paramétricos. BOP: sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica, JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; N.º d. PPD+: número de dientes con PPD≥4 mm; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL≥4 mm; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con

N.º d. PPD+: número de dientes con PPD \geq 4 mm; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL \geq 4 mm; NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; PPD: profundidad de sondaje. *p<0,05; **p<0,01; --- valor no calculable.

En cuanto a la gingivitis, se asoció a valores significativamente más altos de MCP1, JNK y NF κ B, de forma estadísticamente significativa, tras realizar el test T de Student para muestras independientes (tabla 28).

Tabla 28. Valores promedio de las proteínas inflamatorias cuantificadas mediante Western blot según la presencia/ausencia de gingivitis.

Parámetros	Sano	Gingivitis
MCP1 (%)	99,8 \pm 42,8	165,0 \pm 89,9***
JNK (%)	103,0 \pm 34,8	154,2 \pm 55,3***
NFκB (%)	110,1 \pm 96,9	203,5 \pm 141,2***

Los datos se expresan como media \pm SD, teniendo en cuenta el porcentaje de expresión de la proteína, se realizó el test T de Student para muestras independientes. JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NF κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. ***p<,001.

Para determinar el porcentaje de explicación que presentó el estado periodontal, en base a cada uno de los parámetros periodontales, sobre los valores promedios de los marcadores inflamatorios, realizamos regresiones lineales simples entre ellos. Tras realizar una regresión lineal entre cada uno de los parámetros periodontales y cada una de las proteínas inflamatorias leucocitarias cuantificadas mediante el Western blot que mostraron correlaciones estadísticamente significativas, el BOP obtuvo una regresión lineal estadísticamente significativa con la MCP1, JNK y NF κ B (tabla 29). La inflamación gingival (BOP) explicó en un 14,4% la presencia de valores promedios mayores de MCP1, un 19,7% sobre el JNK, y 14% sobre el NF κ B. No se obtuvo ninguna otra regresión significativa entre las restantes proteínas inflamatorias y los demás parámetros periodontales.

Tabla 29. Regresiones lineales significativas siendo la variable dependiente cada una de las proteínas inflamatorias y las independientes los parámetros periodontales.

Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig.
MCP1					
BOP	5,05	0,396	0,150	0,144	0,001****
constante	88,3				0,000***
JNK					
BOP	4,12	0,457	0,209	0,197	0,000***
constante	93,1				0,000***
CAL	-14,1	0,128	0,016	0,002	0,209
constante	142				0,000***
PPD	-10,1	0,080	0,006	-0,008	0,509
constante	136				0,000***
NFκB					
BOP	8,80	0,390	0,152	0,140	0,001***
constante	83,9				0,000***

Regresiones lineales simples con el método de entrar. B: coeficiente de la regresión; BOP: porcentaje de sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica; JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; PPD: profundidad de sondaje. *p<0,05, ***p<0,001.

Para conocer la probabilidad del grupo PCOS periodontalmente sano y el grupo PCOS con gingivitis, de presentar valores promedios mayores de las proteínas proinflamatorias frente al grupo control y calcular de este modo las OR con un modelo predictivo probabilístico, se llevó a cabo una regresión polinómica, sin obtener resultados estadísticamente significativos (tabla 30).

Tabla 30. Modelo de regresión multinominal, introduciendo como variable dependiente el grupo y como independientes las proteínas inflamatorias cuantificadas mediante Western blot.

Variables de la ecuación (modelo $p=0,000^{***}$) Cox y Snell =0,331						
Grupo 3 categorías politómica		B	Gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
PCOS	Intersección	0,250	1	0,819		
	MCP1	-0,004	1	0,545	0,996	0,983 – 1,00
	JNK	0,003	1	0,749	1,00	0,986 – 1,02
	NFκB	0,000	1	0,875	1,00	0,994 – 1,00
PCOS+	Intersección	-4,761	1	0,001		
	MCP1	0,012	1	0,082	1,01	0,998 – 1,02
	JNK	0,020	1	0,032	1,02	1,00 - 1,04
	NFκB	0,004	1	0,175	1,00	0,998 – 1,01

Regresión logística multinominal determinando los efectos principales, teniendo como categoría de referencia el grupo control, siendo la variable dependiente el grupo y como independientes las variables la MCP1, JNK y NFκB. El valor de Cox y Snell corresponde al valor de la pseudo R^2 . Se estableció el nivel de significación con un valor de $p<0,05$. B: coeficiente de la regresión; Exp (B): exponente B correspondiente al valor de la OR; IC95%: intervalo de confianza para el 95% de la OR; gl: grados de libertad; JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis. $^{***}p<0,001$.

Asociación entre las proteínas inflamatorias cuantificadas mediante Western blot, los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo

Correlaciones bivariadas entre los parámetros bioquímicos y hormonas sexuales con los parámetros inflamatorios cuantificados mediante en el Western blot

Parámetros bioquímicos

Se realizaron correlaciones bivariadas entre las variables bioquímicas (asociadas a la presencia de PDs y que mostraron diferencias entre los grupos) y las proteínas inflamatorias determinadas mediante Western blot (tabla 31). Además, se llevaron a cabo correlaciones con los demás parámetros bioquímicos que, muchos de ellos, aunque no se asociaron a la presencia de PDs, podrían relacionarse con la presencia de marcadores inflamatorios. La

MCP1 se correlacionó con los triglicéridos en la población total y en el grupo control, pero no en los grupos PCOS. La JNK se correlacionó positivamente con el HDLc en las PCOS periodontalmente sanas y negativamente con el C3 en las PCOS con gingivitis. De igual manera, el C3 se correlacionó negativamente con el NFκB sólo el grupo PCOS con gingivitis. Dentro de los parámetros bioquímicos no asociados a la presencia de PDs, solo la A1c mostró una correlación significativa con el NFκB (coeficiente de Spearman=-0,214, p=0,040).

Tabla 31. Correlaciones bivariadas entre las proteínas inflamatorias determinadas mediante Western blot y las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	Insulina	HOMA	Triglicéridos	HDLc	C3
MCP1					
P. total	0,092	0,076	0,263**	-0,151	0,094
Controles	-0,226	-0,261	0,416**	-0,071	0,128
PCOS	-0,162	-0,157	-0,255	0,013	-0,065
PCOS+	0,297	0,371	0,282	-0,162	0,301
JNK					
P. total	0,056	0,026	0,107	-0,030	-0,011
Controles	0,359	0,284	-0,273	-0,020	0,237
PCOS	0,029	0,007	0,199	0,435*	-0,017
PCOS+	-0,292	-0,266	-0,212	-0,087	-0,446*
NFκB					
P. total	0,039	0,030	0,015	0,038	0,008
Controles	-0,122	-0,152	0,233	0,359	-0,212
PCOS	0,162	0,159	-0,045	0,148	0,154
PCOS+	-0,337	-0,344	-0,304	-0,036	-0,476*

C3: complemento 3; HDLc: colesterol de alta densidad; HOMA: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis. *p<0,05.

Hormonas sexuales

Al realizar las correlaciones bivariadas entre cada una de las hormonas sexuales y las proteínas inflamatorias, la única hormona sexual que mostró correlación significativa fue la 17OH-progesterona con el MCP1 (tabla 32). No se obtuvo

ninguna otra correlación significativa entre las restantes hormonas sexuales y las proteínas inflamatorias.

Tabla 32. Correlaciones bivariadas entre las proteínas inflamatorias y las hormonas sexuales que mostraron diferencias entre los grupos.

Parámetros	Coeficiente de correlación	
	Estradiol	17 Hidroxiprogesterona
MCP1		
P. total	0,196	0,283*
PCOS	0,294	0,271
PCOS+	0,170	0,286
Controles	0,060	0,434*
JNK		
P. total	-0,158	0,125
PCOS	-0,133	0,396
PCOS+	0,014	0,387
Controles	-0,402	-0,200
NFκB		
P. total	-0,012	-0,002
PCOS	0,039	0,213
PCOS+	0,044	0,197
Controles	-0,031	-0,121

JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis. * $p < 0,05$.

Para conocer la influencia de los parámetros bioquímicos y hormonas sexuales sobre los valores promedios de los marcadores inflamatorios, se realizaron regresiones lineales simples entre ellos. La única regresión lineal significativa fue la obtenida entre la MCP1 y los triglicéridos (tabla 33). Los triglicéridos explicaron en un 5,6% los valores promedios mayores de MCP1. Las demás proteínas no mostraron regresiones estadísticamente significativas con ninguna de las variables bioquímicas ni tampoco con las hormonas sexuales.

Tabla 33. Regresiones lineales simples entre las proteínas inflamatorias determinadas mediante Western blot (como variables dependientes) y los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales (como variables independientes).

Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig
MCP1					
Triglicéridos	0,395	0,267	0,069	0,056	0,027*
constante	89,9				0,000***
MCP1					
17 Hidroxiprogesterona	-0,484	0,030	0,001	-0,014	0,808
constante	120				0,000***
JNK					
C3	-0,015	0,011	0,000	-0,015	0,926
constante	120				0,000***
NFκB					
C3	0,028	0,008	0,000	-0,014	0,944
constante	135				0,007**
A1c	-94,7	0,213	0,045	0,031	0,075
constante	626				0,023*

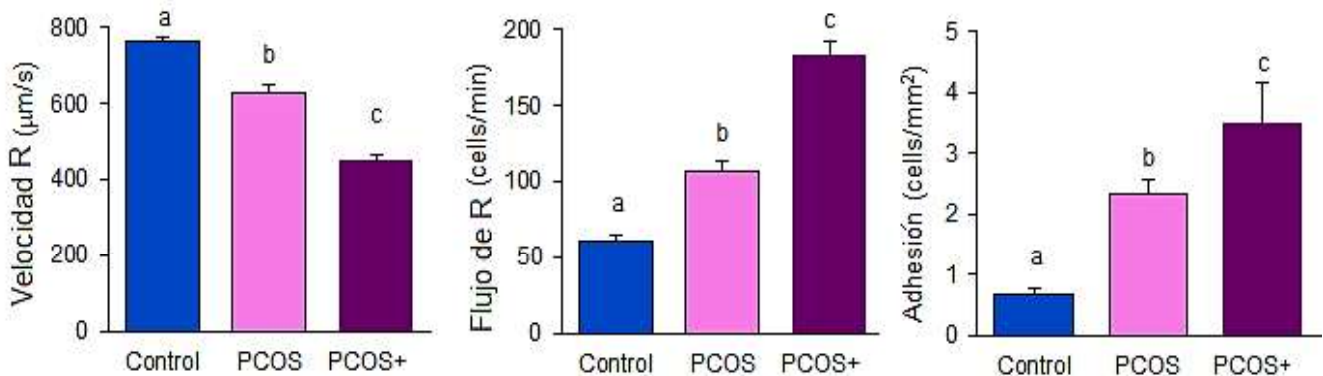
Se muestran los modelos de regresión lineal con el método de entrar. A1c: hemoglobina glicosilada; B: coeficiente de la regresión; C3: complemento 3; JNK: proteínas cinasas c-Jun N-terminal; MCP1: proteína quimioatrayente de monocitos 1; NFκB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas. *p<0,05.

Objetivo 6: Disfunción endotelial –interacción leucocito-endotelio y moléculas de adhesión-

6.1 Interacción leucocito-endotelio

Estos resultados tienen en cuenta tres variables que fueron determinadas tras los análisis de la interacción leucocito-endotelio: la velocidad de rodamiento, el flujo de rodamiento y la adhesión firme. Podemos observar como las pacientes PCOS con gingivitis, mostraron una velocidad de rodamiento menor, un mayor flujo de rodamiento y una mayor adhesión comparado con las PCOS sin gingivitis y con las controles tras aplicar el test ANOVA ($p < 0,001$) (figura 20).

Figura 20. Valores promedio de velocidad de flujo, flujo de rodamiento y adhesión, teniendo en cuenta 3 grupos: PCOS; PCOS con gingivitis y controles (sin PDs).



Los datos se representan como media + error estándar. Los grupos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con un análisis post hoc de Bonferroni. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las medias. PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis.

Asociación entre la toma de medicación y la interacción leucocito endotelio

Aquellas pacientes que registraron la toma de OC mostraron una velocidad de rodamiento significativamente menor ($584,5 \pm 27,1 \mu\text{m/s}$) comparado con aquellas que no tomaron OC ($699,3 \pm 121,3 \mu\text{m/s}$) tras realizar el test T de Student ($p=0,000$).

De igual manera, la toma de OC mostró un promedio de flujo de rodamiento mayor ($119,7 \pm 60,1 \text{ cells/min}$) comparado con las pacientes que no tomaron OC ($87,6 \pm 48,8 \text{ cells/min}$) tras aplicar el test T de Student ($p=0,000$) de forma

estadísticamente significativa. La adhesión no mostró diferencias con la toma de OC, aquellas pacientes que tomaron OC mostraron una media similar a aquellas pacientes que no tomaron OC (sin OC media de adhesión $1,42 \pm 1,54$ cells/mm² y con OC $2,18 \pm 2,24$ cells/mm², T de Student $p=0,093$).

En cuanto a la toma de metformina, se asoció de forma significativa a una mayor adhesión, las pacientes que tomaron metformina mostraron una media de $2,85 \pm 2,16$ cells/mm² frente al valor promedio de $1,47 \pm 1,68$ cells/mm² de las que no tomaron metformina, tras aplicar el test T de Student ($p=0,044$). La velocidad y el flujo de rodamiento no mostraron diferencias significativas al comparar a las pacientes que tomaron metformina frente a aquellas que si la tomaron.

Asociación de la interacción leucocito-endotelio con los parámetros periodontales, la presencia de gingivitis y el grupo

Correlaciones bivariadas entre los parámetros periodontales y la velocidad de rodamiento, flujo de rodamiento y la adhesión, teniendo en cuenta el grupo

Se encontraron correlaciones estadísticamente significativas entre el BOP y los tres parámetros de la interacción leucocito-endotelio. El número de dientes con $CAL \geq 4$ mm se correlacionó de forma positiva con el flujo de rodamiento y también con una mayor adhesión (tabla 34).

Tabla 34. Correlaciones bivariadas entre los parámetros periodontales y la velocidad de flujo, el flujo de rodamiento y la adhesión.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
Velocidad de rodamiento					
P. total	-0,438***	0,014	-0,031	-0,054	-0,171
Controles	-0,063	0,085	0,102	-0,007	-0,118
PCOS	-0,042	0,074	0,044	0,226	-0,114
PCOS+	-0,459	0,090	0,229	-0,231	0,047
Flujo de rodamiento					
P. total	0,461***	0,130	0,142	0,114	0,077
Controles	0,095	0,165	0,152	0,155	0,385**
PCOS	0,194	0,118	0,082	-0,046	0,005
PCOS+	-0,428	0,081	-0,057	-0,123	-0,248

Parámetros	Coeficientes de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
Adhesión					
P. total	0.245	-0,025	0,005	0,057	,297**
Controles	-0,055	0,019	0,018	-0,033	-0,112
PCOS	-0,184	-0,069	-0,095	-0,212	0,347**
PCOS+	-0,565*	-0,191	-0,117	0,195	0,210

Se llevaron a cabo las correlaciones de Spearman para los datos no paramétricos y Pearson para los datos normales. BOP: sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica, N.º d. PPD+: número de dientes con PPD \geq 4 mm; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL \geq 4 mm; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; PPD: profundidad de sondaje. **p<0,01; ***p<0,001.

Al analizar cómo influye la presencia de gingivitis en las variables de la interacción leucocito endotelio, vemos como aquellas pacientes que son periodontalmente sanas presentan mejores resultados en los parámetros de la interacción leucocito-endotelio; con una mayor velocidad de rodamiento y menor flujo de rodamiento y una menor adhesión, de forma estadísticamente significativa tras aplicar el test T de Student (tabla 35).

Tabla 35. Valores de la interacción leucocito endotelio según la presencia/ausencia de gingivitis.

Parámetros	Sano	Gingivitis
Velocidad ($\mu\text{m/s}$)	695,1 \pm 123,6	472,1 \pm 74,4***
Flujo de R. (cells/min)	86,4 \pm 46,0	167,0 \pm 52,3***
Adhesión (cells/mm ²)	1,36 \pm 1,42	3,44 \pm 2,79***

Se presentan las medias \pm SD, tras realizar la prueba T de Student para muestras independientes. Flujo de R.: flujo de rodamiento; velocidad: velocidad de rodamiento. ***p<0,001.

Dado que la inflamación gingival (BOP) se asoció a la presencia de valores mayores de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio, realizamos regresiones lineales simples para ver el porcentaje de explicación del BOP sobre dichos parámetros. Se encontraron modelos de regresión lineal estadísticamente significativos con la variable BOP, en todos los parámetros de la interacción leucocito-endotelio. Con este modelo, podemos observar como la presencia de BOP podría explicar (con una potencia estadística moderada) el empeoramiento de los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelial.

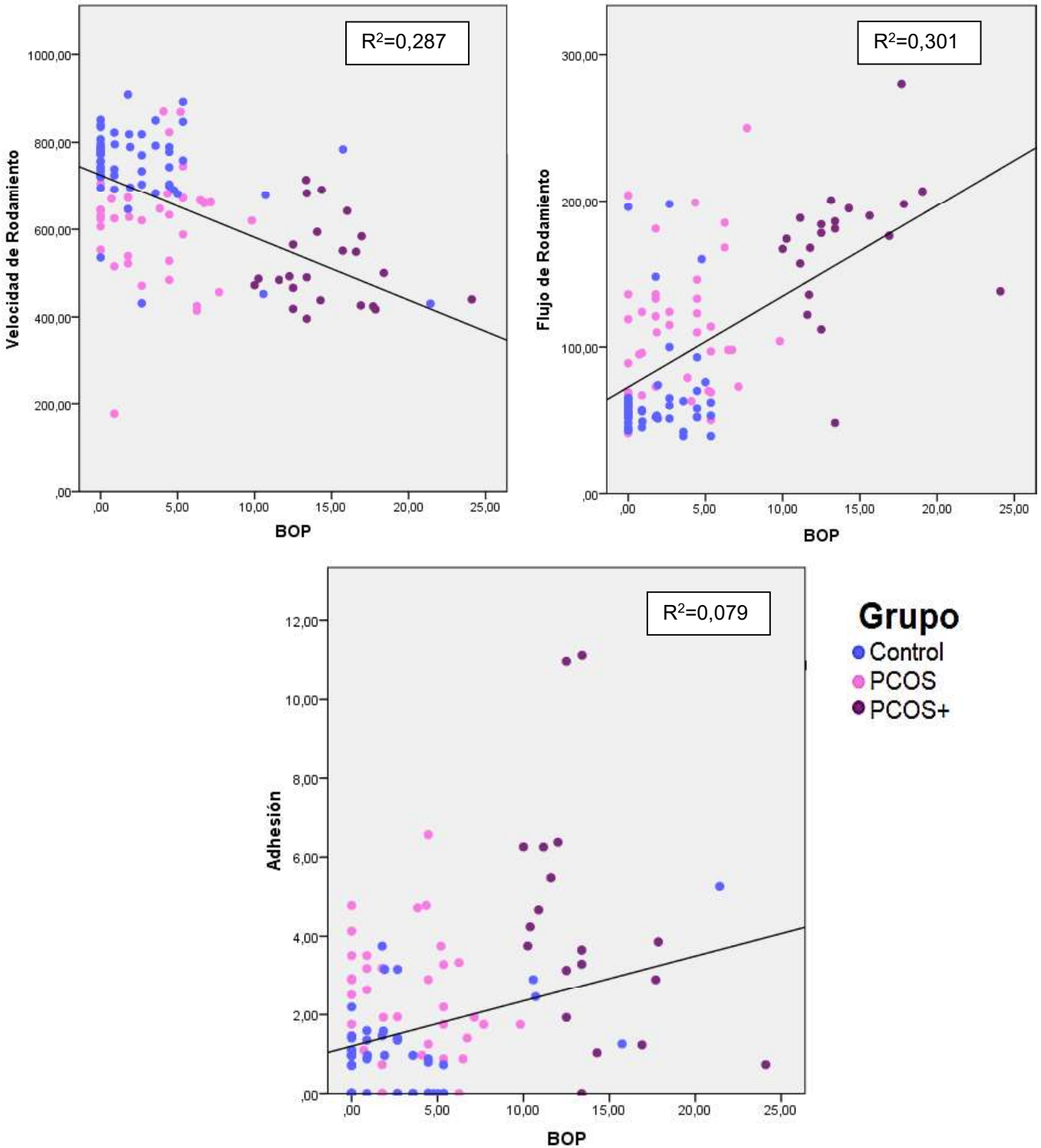
Concretamente, el BOP explicaría en un 30,1% el flujo de rodamiento, en un 28,7% la velocidad de rodamiento y en un 7,9% la adhesión (tabla 36 y figura 21).

Tabla 36. Modelos de regresiones lineales simples, introduciendo en el modelo como variable dependiente cada parámetro de la interacción leucocito endotelial y como variable independiente el BOP.

Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig.
Velocidad de rodamiento					
BOP	-15,7	0,542	0,294	0,287	0,000***
constante	727				0,000***
Flujo de rodamiento					
BOP	6,21	0,555	0,308	0,301	0,000***
constante	72,6				0,000***
Adhesión					
BOP	0,110	0,297	0,088	0,079	0,002**
constante	1,21				0,000***

Modelos de regresiones lineales simples. B: coeficiente de la regresión; BOP: sangrado al sondaje. **p<0,01; ***p<0,001.

Figura 21. Representación gráfica de las regresiones lineales simples (dispersión de residuos) teniendo en cuenta la pertenencia al grupo PCOS, PCOS con gingivitis y el control.



BOP: sangrado al sondaje; PCOS: pacientes con PCOS periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con PCOS con gingivitis.

En la figura 21, podemos observar como los puntos morados de dispersión que corresponden a las pacientes PCOS con gingivitis, se disponen en una zona alejada a los demás grupos y siguen la dirección de la recta de regresión en la velocidad y adhesión. Sin embargo, la dispersión de los puntos del flujo de rodamiento, aunque presenta una regresión lineal significativa, no muestra agrupación clara de los puntos, destacando el grupo PCOS periodontalmente sanas frente a los demás grupos.

Para conocer el porcentaje de influencia de la gingivitis y el grupo PCOS sobre los valores promedio de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio, realizamos regresiones lineales simples entre ellos. La velocidad de rodamiento, el flujo de rodamiento y la adhesión, mostraron modelos de regresiones lineales simples significativas con el grupo PCOS, sin encontrarse resultados significativos con la presencia de gingivitis (tabla 37). Pertenecer al grupo PCOS explicaría en un 48,6% los peores resultados obtenidos sobre la velocidad de rodamiento, en un 39,1% el flujo y en un 29,1% la adhesión.

Tabla 37. Modelos de regresiones lineales simples, siendo la variable dependiente cada uno de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio y como independientes la presencia de gingivitis y el grupo.

Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig.
Velocidad de rodamiento					
Modelo		0,705	0,496	0,486	0,000***
Grupo	-135,4				0,000***
Gingivitis	-12,3				0,780
constante	755				0,000***
Flujo de rodamiento					
Modelo		0,635	0,403	0,391	0,000***
Grupo	44,1				0,000***
Gingivitis	12,0				0,518
constante	66,7				0,000***
Adhesión					
Modelo		0,552	0,304	0,291	0,000***
Grupo	1,50				0,000***
Gingivitis	-0,271				0,684
constante	0,709				0,001***

Modelo de regresiones lineales simples con el método de entrar. B: coeficiente de la regresión. ***p<0,001.

Para determinar la probabilidad de los grupos de presentar peores resultados en los parámetros de la interacción leucocito-endotelio, realizamos un modelo logístico multinomial. En este modelo podemos ver como en grupo PCOS con gingivitis presenta una mayor probabilidad de tener valores menores de velocidad de rodamiento y mayor adhesión celular introduciendo como categoría de referencia el grupo control. Lo mismo ocurre con el grupo PCOS periodontalmente sanas (tabla 38). Sin embargo, el flujo de rodamiento no mostró valores estadísticamente significativos con el grupo en el modelo logístico multinomial.

Tabla 38. Modelo de regresión logística multinomial, siendo la variable dependiente el grupo y las independientes los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelio.

Variables de la ecuación (modelo p=0,000)*** Cox y Snell =0,544						
Grupo	3 categorías politómica	B	gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
PCOS	Intersección	5,105	1	0,143		
	Velocidad	-0,010	1	0,018*	0,990	0,982 – 0,998
	Flujo de R.	0,007	1	0,500	1,007	0,987 – 1,02
	Adhesión	0,706	1	0,006**	2,026	1,222 – 3,36
PCOS+	Intersección	5,675	1	0,173		
	Velocidad	-0,018	1	0,001***	0,983	0,972 – 0,993
	Flujo de R.	0,020	1	0,104	1,020	0,996 – 1,04
	Adhesión	0,935	1	0,002**	2,547	1,394 – 4,65

Regresión logística multinomial, teniendo como categoría de referencia el grupo control, siendo la variable dependiente el grupo y como independientes las variables velocidad, flujo de rodamiento y adhesión. El valor de Cox y Snell corresponde al valor de la pseudo R². Exp (B): exponente B equivalente al valor de OR; Flujo de R.: flujo de rodamiento; gl: grados de libertad; IC95: intervalo de confianza para el 95% del valor de OR; Velocidad: velocidad de rodamiento. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Asociación de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio con los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo

Parámetros bioquímicos

Se realizaron correlaciones bivariadas entre los parámetros bioquímicos que mostraron diferencias significativas entre los grupos con los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelio. En la tabla 39 observamos como las

variables bioquímicas insulina, HOMA, triglicéridos y C3 (cuyo aumento se asoció a la presencia de PDs) mostraron correlaciones estadísticamente significativas con los parámetros de la interacción leucocito-endotelio.

La velocidad de rodamiento se correlacionó negativamente con la insulina, HOMA, los triglicéridos y C3; el flujo de rodamiento se correlacionó positivamente con la insulina, HOMA, triglicéridos y C3 y la adhesión se correlacionó positivamente con los triglicéridos y C3. Sin embargo, el HDLc, no mostró correlaciones significativas con ninguno de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio. Por ello, podemos decir que el aumento de la insulina, los triglicéridos y C3 fue proporcional al empeoramiento de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio.

Además, se estudiaron todas las posibles correlaciones entre los restantes parámetros bioquímicos que, aunque no se asociaron a la presencia de PDs (tabla 40), mostraron diferencias significativas entre los grupos. Podemos observar como valores menores de velocidad de rodamiento se correlacionaron con valores mayores de RBP4. Además, el RBP4 también se correlacionó con valores mayores de flujo de rodamiento y adhesión. Por otro lado, el colesterol solo se correlacionó con la adhesión.

Tabla 39. Correlaciones bivariadas de Pearson entre los parámetros bioquímicos (que mostraron diferencias significativas entre los grupos y que se asociaron a la presencia de PDs) y los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelio.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	Insulina	HOMA	Triglicéridos	HDLc	C3
Velocidad de rodamiento					
P. total	-0,280**	-0,234**	-0,393**	0,143	-0,369**
Controles	-0,203	-0,157	-0,320	0,085	-0,129
PCOS	-0,071	-0,026	-0,268	-0,114	-0,247
PCOS+	-0,125	-0,154	-0,088	0,194	0,001

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	Insulina	HOMA	Triglicéridos	HDLc	C3
Flujo de rodamiento					
P. total	0,232**	0,203**	0,235**	-0,188	0,281**
Controles	0,076	0,009	0,307	-0,041	0,043
PCOS	0,120	0,109	-0,037	-0,131	0,165
PCOS+	-0,213	-0,220	-0,149	0,138	-0,100
Adhesión					
P. total	0,090	0,074	0,206*	0,003	0,201**
Controles	0,322	0,242	0,095	0,180	-0,002
PCOS	-0,150	-0,141	-0,026	-0,009	0,021
PCOS+	-0,278	-0,247	0,122	0,503	-0,012

C3: complemento 3; HDLc: colesterol de alta densidad; HOMA: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Tabla 40. Correlaciones bivariadas entre los restantes parámetros bioquímicos (no asociados a la presencia de PDs) y los parámetros medidos en la interacción leucocito-endotelio, que mostraron resultados estadísticamente significativos.

Parámetros	Coeficiente de correlación		
	Colesterol	RBP4	hsCRP
Velocidad de rodamiento			
P. total	-0,169	-0,280**	-0,058
Controles	-0,079	-0,229	-0,052
PCOS	-0,077	-0,109	0,066
PCOS+	0,386	0,270	0,001
Flujo de rodamiento			
P. total	0,157	0,231**	-0,046
Controles	0,212	0,369**	-0,125
PCOS	-0,057	-0,004	-0,188
PCOS+	-0,048	-0,302	-0,031
Adhesión			
P. total	0,316**	0,360**	-0,004
Controles	0,127	0,281*	-0,115
PCOS	0,412**	0,125	-0,076
PCOS+	0,113	0,429	-0,162

Correlaciones bivariadas de Pearson. hsCRP: proteína C reactiva ultrasensible; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario

poliquístico con gingivitis; RBP4: proteína fijadora de retinol A. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Hormonas sexuales

Se realizaron correlaciones bivariadas entre las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre los grupos y los parámetros de la interacción leucocito endotelio. Se obtuvo una correlación estadísticamente significativa positiva entre la velocidad de rodamiento con el estradiol. Además, el estradiol, también mostró una correlación negativa con el flujo de rodamiento. La hormona 17OH-progesterona se correlacionó de forma negativa con la adhesión (tabla 41). Para descartar otras asociaciones, se correlacionaron las restantes hormonas sexuales con los parámetros de la interacción leucocito-endotelio, encontrándose una correlación negativa entre la prolactina y el flujo de rodamiento (coeficiente de Spearman=-0,225, $p=0,023$) y entre la prolactina y la adhesión (coeficiente de Spearman=-0,201, $p=0,042$).

Tabla 41. Correlaciones bivariadas de Spearman entre las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre los grupos y los parámetros de la interacción leucocito-endotelio.

Parámetros	Coeficiente de correlación	
	Estradiol	17 Hidroxiprogesterona
Velocidad de rodamiento		
P. total	0,275**	0,180
PCOS	0,112	-0,039
PCOS+	-0,138	-0,020
Controles	0,278	0,187
Flujo de rodamiento		
P. total	-0,248*	-0,137
PCOS	-0,127	0,090
PCOS+	0,327	0,143
Controles	-0,324*	-0,180
Adhesión		
P. total	-0,097	-0,264**
PCOS	0,092	-0,217
PCOS+	0,103	0,262
Controles	0,038	-0,281

P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para conocer cómo influyen los parámetros bioquímicos y las hormonas sexuales sobre la velocidad de rodamiento, el flujo de rodamiento y la adhesión, realizamos regresiones lineales entre ellos. La velocidad de rodamiento presentó una regresión lineal simple con la insulina, triglicéridos, C3 y el estradiol. El flujo de rodamiento mostró una regresión lineal simple significativa con los triglicéridos, C3 y el estradiol, y la adhesión mostró una regresión lineal significativa con el C3, colesterol total y la RBP4, aunque las constantes de los modelos no fueron significativas (tabla 42).

Tabla 42. Modelos de regresiones lineales simples siendo la variable dependiente cada uno de los parámetros de la interacción leucocito-endotelio y las independientes los parámetros bioquímicos y hormonas sexuales con los que se encontraron correlaciones estadísticamente significativas.

Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig.
Velocidad de rodamiento					
Insulina	-6,70	0,280	0,079	0,070	0,004**
constante	722				0,000***
Triglicéridos	-1,20	0,393	0,155	0,146	0,000***
constante	757				0,000***
C3	-1,56	0,369	0,136	0,127	0,000***
constante	849				0,000***
RBP4	-79,6	0,280	0,079	0,069	0,004**
constante	820				0,000***
hsCRP	-0,652	0,058	0,003	-0,006	0,560
constante	668				0,000***
Estradiol	0,440	0,252	0,064	0,055	0,010**
constante	633				0,000***
Flujo de rodamiento					
Triglicéridos	0,281	0,235	0,055	0,046	0,016*
constante	75,8				0,000***
C3	0,464	0,281	0,079	0,070	0,004**
constante	43,1				0,026*
Colesterol	0,251	0,157	0,025	0,015	0,111
constante	50,4				0,090
RBP4	24,8	0,231	0,053	0,044	0,020*
constante	47,6				0,025*
Estradiol	-1,71	0,254	0,065	0,055	0,009**
constante	109				0,000***

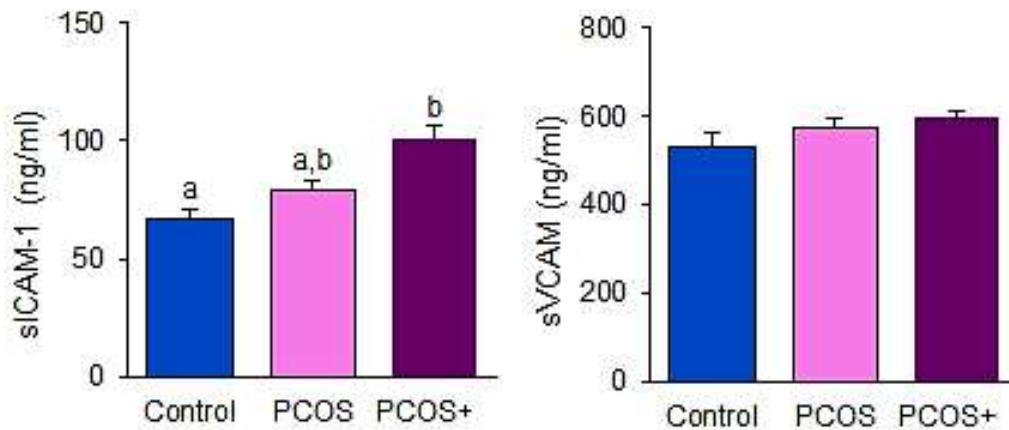
Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig.
Adhesión					
C3	0,011	0,201	0,040	0,031	0,041*
constante	0,348				0,590
Colesterol	0,017	0,316	0,100	0,091	0,001***
constante	-1,48				0,118
RBP4	1,30	0,360	0,130	0,121	0,000***
constante	-0,904				0,180
17 Hidroxiprogesterona	-0,006	0,074	0,005	-0,005	0,469
constante	1,64				0,000***

Modelos de regresiones lineales simples con el método de entrar. B: coeficiente de la regresión; C3: complemento 3; hsCRP: proteína C reactiva ultrasensible; RBP4: proteína fijadora de retinol A. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

6.2 Moléculas de adhesión: sICAM y sVCAM

Para completar el estudio de la función endotelial se cuantificaron los niveles séricos de las moléculas de adhesión sICAM1 y sVCAM. Tras aplicar el test ANOVA, encontramos diferencias significativas de la sICAM1 entre el grupo PCOS con gingivitis y las controles (según la prueba post hoc de Bonferroni). Aunque no hayan existido diferencias entre los valores de sVCAM, podemos apreciar cómo se presenta una ligera tendencia ($p=0,154$) de aumento de la expresión de esta proteína en el grupo PCOS con gingivitis (figura 22).

Figura 22. Valores promedio de sICAM y sVCAM1 según el grupo y las diferencias significativas tras aplicar el test ANOVA.



Los datos se representan como media + error estándar. Los grupos se analizaron mediante una ANOVA de una vía con un análisis post hoc de Bonferroni. Los diferentes superíndices indican diferencias significativas entre las medias. sICAM: molécula de adhesión intercelular soluble; sVCAM1: molécula de adhesión vascular soluble 1.

Asociación entre la toma de medicación y las moléculas de adhesión

La toma de OC no se asoció a cambios en la expresión de las sVCAM ni sICAM1 dado que se mostraron valores similares de las proteínas sICAM (sICAM toma de OC=88,8 ± 25,1 ng/mL, sin OC=95,7 ± 127,2, T de Student para muestras independientes $p=0,731$) y sVCAM (toma OC=597,2 ± 115,6 ng/mL, sin OC=541,2 ± 159,0 ng/mL, T de Student para muestras independientes $p=0,086$) con respecto a la toma/no toma de OC. De igual manera, la toma de metformina no mostró diferencias la media de sICAM1 (si toma metformina 88,6 ± 22,5

ng/mL, no toma metformina=93,8 ±107,8 ng/mL, T de Student para muestras independientes p=0,698) y sVCAM (toma de metformina=592,2 ± 146,6 ng/mL, sin metformina=557,3 ± 147,1 ng/mL, T de Student para muestras independientes p=0,515).

Asociación entre el estado periodontal y las moléculas de adhesión

En cuanto al estado periodontal, se calcularon los valores promedio de las moléculas de adhesión, diferenciando a los pacientes por la presencia de gingivitis o por ser periodontalmente sanas, realizándose el test T de Student para muestras independientes. La presencia de gingivitis se asoció a un aumento de las sICAM1 de forma estadísticamente significativa, mientras que la sVCAM no mostró diferencias en cuanto al estado periodontal (tabla 43).

Tabla 43. Valores promedio de moléculas de adhesión según el estado periodontal.

Parámetros	Sano	Gingivitis
sICAM1 (ng/mL)	74,5 ± 19,0	133,8 ± 175,0*
sVCAM (ng/mL)	553,3 ± 145,6	580,0 ± 149,8

Se presentan los valores como la media ± SD, se realizó la prueba T de Student para muestras independientes. sICAM1: molécula de adhesión intercelular soluble 1; sVCAM: molécula de adhesión vascular soluble. *p<0,05.

Correlaciones bivariadas entre las moléculas de adhesión y los parámetros periodontales

El BOP se correlacionó positivamente con las sICAM1 de forma positiva, teniendo en cuenta a la subpoblación en su conjunto. Podemos observar como valores mayores de BOP se asocian a mayores valores de sICAM1. Los demás parámetros periodontales no mostraron correlaciones significativas con la sICAM ni la VCAM (tabla 44).

Tabla 44. Correlaciones bivariadas entre las moléculas de adhesión y los parámetros periodontales.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	BOP	CAL	PPD	N.º d. PPD+	N.º d. CAL+
sICAM1					
P. total	0,396***	-0,030	0,047	0,006	-0,006
Controles	-0,051	0,218	0,190	-0,194	---
PCOS	-0,005	-0,093	-0,092	0,173	-0,133
PCOS+	0,003	-0,442	-0,364	0,626	0,918
sVCAM					
P. total	0,163	0,117	0,092	0,059	-0,024
PCOS	-0,145	-0,205	-0,157	0,119	0,033
PCOS+	0,362	0,185	0,081	0,073	-0,137
Controles	-0,017	0,212	0,191	-0,097	---

Se realizaron las correlaciones de Spearman en las correlaciones que incluyeron el BOP, CAL y PPD y las de Pearson con para el número de dientes con PPD \geq 4 mm y CAL \geq 4 mm. BOP: sangrado al sondaje; CAL: nivel de inserción clínica; N.º d. CAL+: número de dientes con CAL \geq 4 mm; N.º d. PPD+: número de dientes con PPD \geq 4 mm; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; PPD: profundidad de sondaje; ICAM: moléculas de adhesión intercelular; VCAM: moléculas de adhesión vascular. ***p<0,001, --- valores no cuantificables.

Para determinar el porcentaje de influencia de las moléculas de adhesión sobre los parámetros periodontales, realizamos regresiones lineales simples entre ellos. Aunque el BOP se correlacionó con la sICAM, la regresión lineal no mostró valores estadísticamente significativos (tabla 45). Para determinar cualquier otra asociación entre las moléculas de adhesión y los parámetros periodontales, se realizaron regresiones lineales con la sICAM1 y sVCAM y cada uno de los parámetros periodontales, sin encontrarse resultados significativos.

Tabla 45. Regresiones lineales simples introduciendo como la variable dependiente el BOP y como independiente la sICAM.

Parámetros	B	R	R ²	R ² ajustado	Sig.
BOP					
sICAM1	0,012	0,200	0,040	0,026	0,096
constante	4,52				0,000***

Modelo de regresión lineal simple con el método de entrar. B: coeficiente de la regresión para la variable; BOP: sangrado al sondaje; sICAM1: moléculas de adhesión intercelular soluble 1. ***p<0,001.

Para calcular la probabilidad de presentar mayores valores de moléculas de adhesión diferenciando por pertenecer al grupo PCOS, PCOS con gingivitis o control, realizamos una regresión multinomial, siendo la categoría de referencia en grupo control (tabla 46). El grupo PCOS con gingivitis mostró una OR=1,06 ante la sICAM1 de forma estadísticamente significativa. Con este modelo, podemos ver como las pacientes PCOS con gingivitis se muestran un 6% más de probabilidad de presentar un promedio mayor de sICAM1, comparadas con las controles.

Tabla 46. Modelo de regresión multinomial, siendo la variable dependiente el grupo y las variables independientes las moléculas de adhesión.

Variables de la ecuación (modelo p=0,000)*** Cox y Snell =0,274						
Grupo 3 categorías politómica		B	Gl	Sig.	Exp (B)	IC 95%
PCOS	Intersección	-3,835	1	0,026*		
	sICAM1	0,029	1	0,132	1,029	0,991 – 1,06
	sVCAM	0,004	1	0,224	1,004	0,998 – 1,01
PCOS+	Intersección	-6,656	1	0,001***		
	sICAM1	0,062	1	0,003**	1,064	1,021 – 1,10
	sVCAM	0,003	1	0,360	1,003	0,996 – 1,01

La categoría de referencia fue grupo control. El valor de Cox y Snell corresponde al valor de la pseudo R². Exp (B): exponente B equivalente al valor de OR; gl: grados de libertad; IC95: intervalo de confianza para el 95% del valor de OR; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; sICAM1: moléculas de adhesión intercelular soluble 1; sVCAM: moléculas de adhesión vascular soluble. *p<0,05.

Asociación entre las moléculas de adhesión y los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales y el grupo

Parámetros bioquímicos

Para estudiar la asociación entre los parámetros bioquímicos y las moléculas de adhesión, se realizaron correlaciones bivariadas de Pearson entre cada uno de ellos. En la tabla 47 se muestran las correlaciones de las variables bioquímicas que se relacionaron con la presencia de PDs, y en la tabla 48 se muestran las correlaciones con variables bioquímicas que se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con alguna de las moléculas de adhesión, pero que no se asociaron a la presencia de PDs. Las demás correlaciones entre la sICAM1 y sVCAM y los parámetros bioquímicos no mostraron correlaciones significativas.

Correlaciones bivariadas de Pearson entre los parámetros bioquímicos con las moléculas de adhesión obtenidos en el Luminex®.

Se obtuvo una correlación significativa positiva con el HDLc y la sVCAM en el grupo control. Las restantes correlaciones no mostraron asociaciones estadísticamente significativas (tabla 47).

Tabla 47. Correlaciones bivariadas entre las moléculas de adhesión y las variables bioquímicas asociadas a la presencia de PDs.

Parámetros	Coeficiente de correlación				
	Insulina	HOMA	Triglicéridos	HDLc	C3
sICAM1					
P. total	-0,009	-0,014	0,046	-0,126	-0,032
Controles	0,298	0,285	0,304	-0,464	0,059
PCOS	-0,027	-0,065	0,104	-0,100	-0,032
PCOS+	-0,179	-0,166	-0,085	0,003	-0,282
sVCAM					
P. total	0,038	0,002	0,029	0,144	0,103
Controles	-0,244	-0,347	-0,179	0,207*	0,058
PCOS	0,000	-0,010	-0,107	0,217	-0,047
PCOS+	0,157	0,098	0,120	0,150	0,221

Correlaciones bivariadas de Pearson. C3: complemento 3; HDLc: colesterol de alta densidad; HOMA: modelo homeostático de evaluación de la resistencia a la insulina; P. total: población total de la submuestra; PCOS: pacientes con síndrome de ovario

poliquístico periodontalmente sanas, PCOS+: pacientes con el síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; sICAM1: moléculas de adhesión intercelular soluble 1; sVCAM: moléculas de adhesión celular vascular soluble. * $p < 0,05$.

Tabla 48. Correlaciones entre la sICAM1 con los parámetros bioquímicos no asociados a la presencia de PDs, que mostraron resultados estadísticamente significativos.

Parámetros	Coeficiente de correlación			
	PCOS	PCOS+	CONTROL	P.TOTAL
sICAM1				
hsCRP	0,263	0,103	-0,161	0,257*

Se presentan los resultados de las correlaciones bivariadas de Spearman que mostraron una correlación estadísticamente significativa entre variables bioquímicas no asociadas a la presencia de PDs, en este caso la hsCRP, teniendo en cuenta como significativo un valor $p < 0,05$. hsCRP: proteína C reactiva ultrasensible; PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; P. Total: población total; sICAM1: molécula de adhesión intercelular soluble 1. * $p < 0,05$.

Hormonas sexuales

Para estudiar la asociación entre las hormonas sexuales (que mostraron diferencias entre los grupos) y las moléculas de adhesión, se realizaron correlaciones bivariadas de Spearman entre cada uno de ellos. El estradiol se correlacionó positivamente con la molécula de adhesión sICAM1 en el grupo control y la 17OH-progesterona se correlacionó la molécula de adhesión sVCAM teniendo en cuenta a la subpoblación en su conjunto y al grupo PCOS con gingivitis (tabla 49). Aunque las correlaciones fueron bajas, podemos ver como existe una tendencia al aumento de las sVCAM ante la presencia de PDs y que conforme aumenta el nivel del 17OH-progesterona aumenta la expresión de las sICAM. Las restantes correlaciones entre el estradiol y la 17OH-progesterona y las sICAM1 y sVCAM no mostraron correlaciones significativas. Además, se realizaron las correlaciones bivariadas entre las restantes hormonas sexuales y las moléculas de adhesión sin encontrarse correlaciones significativas.

Tabla 49. Correlaciones bivariadas de Spearman entre las hormonas sexuales que mostraron diferencias significativas entre los grupos, y moléculas de adhesión cuantificadas con el Luminex®.

Parámetros	Coeficiente de correlación	
	Estradiol	17 Hidroxiprogesterona
sICAM1		
P. total	-0,010	-0,134
Controles	0,483*	-0,105
PCOS	0,075	-0,020
PCOS+	-0,016	-0,003
sVCAM		
P. total	-0,167	-0,321**
Controles	0,027	-0,182
PCOS	-0,003	-0,224
PCOS+	-0,343	-0,472*

Se muestran los coeficientes de las correlaciones bivariadas de Spearman. PCOS: pacientes con síndrome de ovario poliquístico periodontalmente sanas; PCOS+: pacientes con síndrome de ovario poliquístico con gingivitis; P. TOTAL: población total; sICAM1: molécula de adhesión intercelular soluble 1; sVCAM: molécula de adhesión celular vascular soluble. *p<0,05; **p<0,01.

Para determinar el porcentaje de explicación que ejercieron los parámetros bioquímicos y hormonas sexuales sobre los valores promedio de moléculas de adhesión, realizamos modelos de regresiones simples entre ellos. Aunque se ha observado que existió una correlación (baja) entre las hormonas sexuales y la expresión de las moléculas de adhesión, las regresiones lineales no mostraron resultados significativos entre la sICAM1 y sVCAM, con los parámetros bioquímicos con los que mostraron una correlación significativa (tabla 50).

Tabla 50. Regresiones lineales siendo la variable dependiente cada molécula de adhesión y como las independientes los parámetros bioquímicos, hormonas sexuales con las que se obtuvo correlación estadísticamente significativa.

Parámetros	B	R	r ²	r ² ajustado	Sig.
sICAM1					
Estradiol	-0,080	0,056	0,003	-0,012	0,647
constante	98,7				0,000***
hsCRP	-0,036	0,005	0,000	-0,015	0,975
constante	93,3				0,000***
sVCAM					
HDLc	1,39	0,144	0,021	0,007	0,222
contante	471,7				0,000***
17 Hidroxiprogesterona	-6,81	0,194	0,037	0,024	0,103
constante	575				0,000***

Regresiones lineales simples con el método de entrar. B: coeficientes beta correspondientes al valor de la OR; HDLc: colesterol de alta densidad; hsCRP: proteína C reactiva ultrasensible; sICAM1: moléculas de adhesión intercelular soluble 1; sVCAM: moléculas de adhesión celular vascular soluble. **p<0,01; ***p<0,001.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

La asociación de las enfermedades bucodentales con las patologías sistémicas, ha sido y continúa, siendo a día de hoy, un área de investigación de gran interés científico. Concretamente la medicina periodontal, se ha encargado de analizar las asociaciones entre las PDs y las patologías sistémicas de tipo crónico e inflamatorio más prevalentes como la obesidad (1–3), la diabetes (4,5), el síndrome metabólico (2,6,7) y la artritis reumatoide (8). El carácter crónico e inflamatorio de dichas patologías sistémicas, centró diferentes vías de investigación basadas en la presencia de mecanismos fisiopatológicos en común con las patologías periodontales (9,10). Recientes investigaciones, han planteado la asociación entre el PCOS y las PDs (11–20) por ser un síndrome de carácter crónico e inflamatorio. Además, este síndrome presenta frecuentemente comorbilidades (obesidad y TD2) asociadas al aumento de la prevalencia y severidad de las patologías periodontales.

En la presente Tesis Doctoral hemos encontrado una mayor prevalencia de gingivitis en el grupo PCOS comparado con el grupo control, estableciéndose una probabilidad de padecer algún tipo de PDs de 5,36 veces mayor en el grupo PCOS comparado con el grupo control. Estos hallazgos coinciden con el último metaanálisis publicado (18) que aborda los resultados de los estudios clínicos que evaluaron el estado periodontal de las pacientes con PCOS. Los resultados generales de los estudios incluidos en el metaanálisis, revelan que las mujeres con PCOS tienen de promedio un 28 % más de riesgo de desarrollar periodontitis (riesgo relativo 1,28, IC 95 %:1,06–1,55, $p < 0,0001$) con una heterogeneidad moderada entre los estudios analizados, lo que revela alguna variación entre los estudios incluidos. Los resultados de este metaanálisis destacan el estudio de Porwal *et al.*, (16) publicado en el Journal of Periodontology, en el que se establece una OR de 2,88 (IC 95% 1,18-6,98) en el grupo PCOS para la periodontitis comparado con el grupo control, enfatizando en que la prevalencia de la periodontitis fue mayor en aquellas pacientes con PCOS recientemente diagnosticadas, sin recibir tratamiento médico. Otra de las investigaciones destacadas, es el estudio de Tong *et al.*, (17) que fue realizado sobre una cohorte retrospectiva, en la cual se revisaron los registros periodontales obtenidos del sistema sanitario y aseguradoras de Taiwán. Se estableció un riesgo relativo

ante la presencia de periodontitis de 1,44 (IC 95% 1,24–1,67) en el grupo PCOS comparado con controles. Sin embargo, al estudiar el empeoramiento de cada uno de los parámetros periodontales recogidos en el periodontograma (BOP, CAL y PPD) de las diferentes investigaciones, los resultados no muestran unanimidad. En nuestro estudio el BOP, fue significativamente mayor en el grupo PCOS comparado con el grupo control, sin encontrarse diferencias significativas en las variables CAL y PPD. El BOP, que es la variable clínica que representa objetivamente la inflamación gingival, también fue significativamente mayor en pacientes PCOS comparado con controles, en recientes estudios clínicos (12,13,16,19,21–24). La prevalencia de gingivitis estudiada por Özçaka *et al.*, (13,20) fue mayor en aquellas pacientes con PCOS y la severidad de la gingivitis (extensión y afectación periodontal) fue mayor en las pacientes PCOS con gingivitis que en las controles con gingivitis. Estos resultados están en la línea de los publicados por Akcali *et al.*, (12), un estudio de casos y controles, en el que se realiza una exploración periodontal completa. En ellos (12,13,20) los autores coinciden con el planteamiento de la asociación entre el PCOS y las PDs, atribuyéndole una probabilidad mayor a las pacientes con PCOS de desarrollar PDs comparado con las pacientes sin dicho síndrome.

Las discrepancias entre los investigadores, se encuentran principalmente al evaluar los parámetros periodontales PPD y el CAL. Saljoughi *et al.*, (19) en su estudio de casos y controles, encuentra diferencias significativas tanto en el CAL y como en el PPD entre las PCOS con periodontitis y las controles. Sin embargo, cuando compara estos parámetros periodontales en un subgrupo de pacientes con PCOS, pero sin periodontitis, no encuentra diferencias significativas con el grupo control. Lo mismo ocurre en el estudio de Saglam *et al.*, (21) en el que se compara la media de CAL y PDD entre casos y controles con y sin periodontitis. Las diferencias radican en el grupo PCOS con periodontitis frente al grupo PCOS periodontalmente sanas y controles. Por ello, ambos estudios (19,21), coinciden con nuestros hallazgos, ya que aquellas pacientes con PCOS sin afectación periodontal, no muestran diferencias en el CAL y la PPD comparado con controles, sugiriendo que la patología periodontal es la principal responsable de los cambios en estos parámetros periodontales. Por el contrario, las restantes investigaciones encuentran un mayor CAL y PPD en pacientes PCOS con y sin

periodontitis comparado con controles (12,16,22–24). Asimismo, en aquellas pacientes PCOS con periodontitis, se observa una mayor severidad en la afectación periodontal, con valores promedio significativamente mayores de BOP, CAL y PPD, teniendo en cuenta los hábitos de higiene oral, el tabaco, la medicación recibida, y los parámetros antropométricos (12,16,22–24), por lo que el PCOS parecería estar contribuyendo a la alteración de los parámetros periodontales y empeorados en aquellos casos con presencia de periodontitis. Todas las investigaciones (12,13,16,19–24) que analizan la asociación entre el PCOS y las PDs, plantean que la relación entre ambas patologías es bidireccional, y que muchas veces la presencia de PDs en mujeres de edad fértil puede ser el primer signo de padecer PCOS no diagnosticado.

En cuanto a los factores de riesgo modificables asociados a la presencia de PDs como el tabaco, el alcohol y los malos hábitos de higiene oral (6,25–29), en general, nuestra población de estudio, mostró buenos hábitos de higiene oral, bajo promedio de índices de placa y cálculo, consumo bajo de bebidas alcohólicas y la mayoría de las pacientes (casos y controles) fueron no fumadoras. Al tratarse de una población joven y con buenos hábitos, podemos observar aquellos cambios a nivel de los tejidos periodontales, que no pueden atribuirse a factores locales, pero sí podrían deberse a las alteraciones bioquímicas y hormonales presentes en el PCOS y contribuir así en el desarrollo de las PDs. Además, la formación académica, relacionada con la ocupación, educación y situación social (todos ellos considerados como determinantes sociales de la salud por la Organización Mundial de la Salud (30)), fue similar entre casos y controles. Nuestra población de estudio, mostró un nivel de formación alto (estudios universitarios en su mayoría), y en general la categoría “trabajador activo” fue la que tuvo mayor prevalencia en la ocupación. Ninguna de estas variables se asoció a cambios en los parámetros periodontales ni se relacionó con la presencia de PDs en nuestro estudio. Esto podría deberse a que la muestra estudiada tuvo un alto nivel de formación y unos correctos hábitos de higiene oral. En la mayoría de las investigaciones llevadas a cabo sobre el estudio de las patologías periodontales en pacientes con PCOS, se tuvo en cuenta dichos hábitos y se llegó a la conclusión de que incluso con buenos hábitos de higiene oral y ante la ausencia de tabaquismo y alcohol, las pacientes con PCOS se muestran más vulnerables

ante el desarrollo de PDs (12,13,16,19,21–24). Estas afirmaciones, nos hacen indagar en aquellos factores (no relacionados con los hábitos de higiene, hábitos tóxicos, ni tampoco las variables sociodemográficas) que pueden haber estado implicados en la determinación de una mayor prevalencia de gingivitis que encontramos en el grupo PCOS comparado con las controles.

Los análisis estadísticos que realizamos, mostraron una asociación entre los niveles de insulina (y su correspondiente índice HOMA) en sangre con una mayor inflamación gingival (medida con el BOP), un empeoramiento en la inserción clínica (aumento de CAL y PPD) y el posible inicio de periodontitis (medida con la variable número de dientes con PPD \geq 4mm). Concretamente, los modelos predictivos (regresión lineal simple y árbol CHAID exhaustivo) que realizamos nos muestran como la insulina puede propiciar un aumento de la inflamación gingival. Timonen *et al.*, (31) estudiaron cómo influyen las variaciones sistémicas de insulina en una población de pacientes sanos sin obesidad y determinaron un empeoramiento de la salud periodontal a causa de presentar IR incluso en pacientes jóvenes (menores de 50 años). Dado que la IR y la obesidad son frecuentes en el PCOS, se ha relacionado con la vulnerabilidad que presentan dichas pacientes ante el desarrollo de PDs (14,19,23,32).

Por otro lado, también se ha estudiado como la obesidad (BMI \geq 30, que conlleva la alteración en los índices WHR, y WST) y la IR contribuyen al empeoramiento de los signos y síntomas del PCOS (33–35). La IR aumenta la secreción de andrógenos en el ovario y, como consecuencia, se produce un empeoramiento de las manifestaciones clínicas del PCOS como el hirsutismo, el acné y las irregularidades en el ciclo menstrual. Nuestros resultados muestran que, el 22,9% de las pacientes con PCOS presentaron IR y mostraron valores más elevados de BMI y de los índices WHR y WSR comparado con las controles. El BMI y el WSR se correlacionaron de forma estadísticamente significativa con valores mayores de BOP, CAL, PPD y número de dientes con PPD \geq 4mm. Al mismo tiempo, el WHR se correlacionó positivamente con valores mayores de BOP y número de dientes con PPD \geq 4mm. Souza do Santos *et al.*(34) en su estudio de casos y controles, coinciden con nuestros resultados, encontrando mayores niveles de CRP y HOMA en el grupo PCOS (34). Asimismo, nuestro grupo de investigación (36) también encontró esta asociación bidireccional entre

el aumento de los parámetros antropométricos y la prevalencia y severidad de las PDs, coincidiendo con otros autores (2,37,38). Pudimos observar como la pérdida de peso mejoraba el estado periodontal y como el tratamiento periodontal mediante el SRP conseguía reducir la inflamación sistémica (36). Esta asociación bidireccional que plantean los autores (2,14,19,23,32,36–38) se atribuye principalmente al aumento de la inflamación crónica de bajo grado presente en la obesidad, que se asocia a IR, que ocurre tanto en la obesidad como en la periodontitis. Los hallazgos plantean que, al mismo tiempo, el tratamiento periodontal por medio del SRP podría reducir la inflamación crónica de bajo grado y sus consecuencias. Una situación similar, podría presentarse en las pacientes PCOS con IR, que suelen ser pacientes con sobrepeso y obesidad.

Dado que la metformina es un fármaco de uso habitual para el control de la IR, y el control del peso corporal, analizamos la prevalencia de PDs, atendiendo a la toma de metformina, sin encontrarse diferencias estadísticas significativas. La toma de metformina se ha asociado a la mejora de los parámetros periodontales (16) y de las manifestaciones clínicas presentes en el PCOS (39–43), lo cual podría explicarse por el control que ejerce el fármaco sobre la glucemia y el peso corporal. En nuestro estudio solo 11 pacientes tomaron metformina, y durante pocos meses (6 meses) de administración, dado que se trató de PCOS de reciente diagnóstico, lo que podría justificar que la metformina no se haya asociado a la mejora de los parámetros periodontales.

Las alteraciones hormonales presentadas por el grupo con PCOS fueron valores sistémicos más bajos de estradiol y de 17OH-progesterona cuando los comparamos con el grupo control. Estas alteraciones hormonales presentes en el PCOS se han relacionado con cambios en la flora oral, y con el aumento y severidad de las PDs (44–48). Aunque el fenotipo del PCOS también influye en los cambios que puedan existir en los tejidos periodontales. A este respecto Işik *et al.* (49) en su reciente estudio, compararon la afectación periodontal de las pacientes con PCOS según su fenotipo, llegando a la conclusión de que aunque todos los fenotipos se asocian a afectación periodontal, los fenotipos clásicos (A y B, ambos con hiperandrogenismo y oligoanovulación) son los que muestran mayor afectación.

Estas alteraciones hormonales han sido asociadas a cambios en la microbiota oral, en beneficio de los periodontopatógenos comúnmente asociados a las PDs como la *P. gingivalis* y *F. nucleatum* (24). Akcali *et al.*, (24) cuantificaron dichos patógenos, encontrando un recuento significativamente mayor en pacientes con PCOS (con y sin gingivitis), comparado con controles (con y sin gingivitis). Recientemente, Wendland *et al.*, (15) estudiaron la correlación entre los niveles de estradiol y el recuento de *Capnocytophaga gingivalis*, patógeno relacionado con la periodontitis juvenil, cuyo género se asocia a infecciones uterinas e infecciones perinatales en partos prematuros. En dicho estudio, se encontró una correlación positiva entre el estradiol y el recuento de *Capnocytophaga gingivalis*, y además se observó que a mayor niveles de HDLc, menor recuento de este periodontopatógeno (15).

Los resultados de ambos estudios (15,24) nos sugieren que la inflamación gingival, encontrada en mayor medida en las pacientes con PCOS, puede deberse a los cambios hormonales presentes en dicho síndrome. Aunque los cambios en la microbiota oral no son la única causa de que se produzcan las PDs, un cambio hacia una microbiota con predominio de especies periodontopatógenas, aumenta el riesgo de desarrollo de PDs. Por lo tanto, la asociación positiva entre la microbiota oral y la inflamación gingival se ve potenciada aún más por este trastorno endocrino (15,24,44,46,47,50).

Las fluctuaciones hormonales, de progesterona, estrógenos y gonadotropinas (FHS y LH), se han asociado a un mayor riesgo de desarrollo de PDs (44,46,51–53) caracterizado por una mayor reactividad de los tejidos periodontales, con tendencia a la inflamación gingival y una mayor prevalencia de lesiones irritativas como los granulomas gingivales presentes en el embarazo (44,46,51–54). Sin embargo, el efecto de los estrógenos sobre el periodonto, es controvertido. Mientras que durante el embarazo los picos elevados de estrógenos predisponen a las pacientes ante el desarrollo de patologías gingivales (sobre todo de tipo agudo inflamatorio, como la “gingivitis gravídica” y el granuloma piogénico), los niveles significativamente bajos de estrógenos y progestágenos en la menopausia, también parecen tener efectos negativos sobre el periodonto (54–56).

En mujeres con bajos niveles de estrógenos durante la menopausia, se ha encontrado una mayor tendencia a la pérdida de hueso alveolar, mayor CAL, una menor elasticidad en los tejidos (sobre todo debido a la menor vascularización periodontal y menor cantidad de colágeno) que influye tanto en el periodonto como en las patologías temporomandibulares (55).

En esta Tesis Doctoral, las pacientes controles periodontalmente sanas mostraron valores significativamente más altos de estradiol y 17OH-progesterona que el grupo de controles con PDs y las pacientes PCOS (con y sin PDs). Sin embargo, no se encontraron correlaciones significativas entre las hormonas sexuales y los parámetros periodontales, ni tampoco entre las hormonas sexuales y las citoquinas proinflamatorias. Los niveles de FSH y LH no mostraron diferencias significativas, ni tampoco los valores de testosterona libre. Por lo que podemos observar como el estado periodontal (de la población estudiada) no se asoció a fluctuaciones en las hormonas sexuales, ni tampoco se atribuyó la mayor inflamación gingival encontrada en el grupo PCOS a los niveles de hormonas sexuales determinadas.

La toma de OC también se ha vinculado en diversos estudios con un aumento del BOP (45,47,56). En esta investigación la toma de OC no alteró los parámetros periodontales BOP, CAL ni PPD, sin embargo, encontramos una prevalencia algo mayor de PDs en la población estudiada que tomó OC. La toma de OC resulta un tema controvertido, dado que estos fármacos contribuyen al equilibrio hormonal y por consiguiente a reducir los picos de estrógenos y andrógenos relacionados con la inflamación gingival. En esta Tesis Doctoral, la toma de OC podría explicar que, en general, no se hayan encontrado asociaciones entre la alteración del perfil de hormonas sexuales y la presencia de PDs ni tampoco con la alteración de los parámetros periodontales, a pesar de ser más prevalente las PDs en las mujeres que tomaban OC.

Uno de los mecanismos de asociación más estudiados es la implicación de las citoquinas proinflamatorias (presentes en los tejidos periodontales) sobre las patologías sistémicas. Diversos autores han documentado un aumento de ILs, MPO, CRP y TNF α en GCF de pacientes con PCOS con PDs, comparado con

controles (12,13,16,20,23,57). La IL6 está implicada en diversas funciones que promueven la reabsorción ósea periodontal, por lo que se emplea como biomarcador en el inicio y progresión de la periodontitis (58). Tanto la IL6 como el TNF α , promueven el reclutamiento de los leucocitos y participan en otros mecanismos moduladores de la inflamación aguda como la vasodilatación y la activación del complemento. Ambas citoquinas se han encontrado elevadas en pacientes con PCOS (20,34,57), lo que plantea que dichas citoquinas juegan un importante papel en el inicio y progresión de las PDs en las pacientes con PCOS. En nuestra población, los grupos PCOS (con y sin PDs) mostraron valores significativamente más altos de IL6, MPO y TNF α , comparado con el grupo control. Además, encontramos una correlación significativa entre la concentración de TNF α en suero y los parámetros periodontales CAL y PPD, de manera que aquellas pacientes que mostraron valores mayores de TNF α se correspondieron con valores mayores de CAL y PPD. Dursun *et al.*, (23) determinaron en pacientes con PCOS que el volumen de GCF y los niveles de MPO presentes eran significativamente mayores que en las controles y que además, esta MPO se correlacionaba con el empeoramiento de los parámetros clínicos periodontales. Más tarde Akcali *et al.*,(12,59) cuantifican el volumen de GCF y el nivel de MMPs encontrando en el grupo PCOS mayor volumen de GCF y mayor contenido de MMPs comparado con las controles. Ambos autores (12,23,59) observaron cómo incluso en pacientes jóvenes existe un aumento del volumen de GCF y este presentaba un mayor nivel de MPO y MMPs que se correspondió con un peor estado periodontal. Tanto la MPO como las MMPs evidencian el aumento de la inflamación periodontal. Las MMPs son secretadas por las células inflamatorias activadas como los neutrófilos y macrófagos, al igual que la MPO que procede de la degranulación de los neutrófilos en presencia de un proceso inflamatorio. Aunque en la presente Tesis Doctoral no medimos dichas proteínas en GCF, el hecho de que a nivel sistémico encontráramos mayores valores de MPO en las pacientes con PCOS y que se correspondiera con un mayor CAL, nos muestra la importante repercusión que puede tener el PCOS a nivel sistémico siendo de esta forma más probable el desarrollo de PDs en ellas.

Además, el TNF α mostró una correlación significativa positiva, aunque débil con la insulina, el índice HOMA y los triglicéridos en el grupo PCOS, sin mostrar estas

correlaciones en el grupo control. A mismo tiempo, la MPO, se correlacionó positivamente con la insulina, el índice HOMA. Evidenciándose de esta forma, una proporción mayor de marcadores inflamatorios en el grupo PCOS correlativos a la alteración del perfil lipídico y al HOMA.

En diversas publicaciones, la MPO, el TNF α y las MMPs en pacientes con periodontitis se ha asociado a un mayor riesgo de enfermedad CV (12,59–61). A este respecto, la MPO contribuiría a la oxidación lipídica de las LDL, favoreciendo el reclutamiento de los macrófagos y la formación de células espumosas que participa en la formación de la placa de ateroma. De hecho, los niveles de MPO se han visto incrementados en aquellas pacientes PCOS con IR (57). La correlación entre la MPO con el nivel de inserción clínica (medida con el CAL) de las pacientes PCOS analizadas en este estudio, sugiere que, niveles de MPO altos podrían indicar un comienzo en el empeoramiento de la salud periodontal, en etapas tempranas de las PDs. Otra de las ILs relacionadas con la periodontitis y con la IR, es la CRP. Se la relaciona con los procesos inflamatorios y se ha demostrado incluso la reducción de esta, tras el tratamiento periodontal (36,62,63). Nuestros resultados muestran como la CRP en suero fue significativamente mayor en el grupo PCOS, sin embargo, no mostró correlación con los parámetros periodontales, ni tampoco mostró diferencias al comparar el grupo PCOS con gingivitis frente a las pacientes del grupo PCOS periodontalmente sanas. La presencia de valores mayores de CRP en el grupo PCOS, podría contribuir al desarrollo de las PDs en dichas pacientes (64,65). Además, la CRP se ha relacionado con el desarrollo de obesidad y T2D (66), ambas relacionadas con el empeoramiento de los signos y síntomas del PCOS (34,35,67–70) y de las PDs (2,36,38,71–74).

En los últimos años, se ha estudiado el efecto de la activación de la inmunidad innata por los inflamasomas, sobre los tejidos periodontales. Como hemos comentado anteriormente, los inflamasomas son complejos multiproteicos formados por una molécula sensora llamada receptor de reconocimiento de patrones NLR, una molécula adaptadora ASC y la proteasa caspasa-1. Dentro de los inflamasomas actualmente identificados, el NLRP3 se ha relacionado con el inicio y la progresión de las PDs (75–78). La activación de NLRP3 se ha asociado a un aumento de la actividad osteoclástica a nivel periodontal (cuando

existe una infección) a través de la activación de la vía del NFκB produciendo IL1β (75–78).

El papel del LPS de las bacterias periodontopatógenas (Gram negativas), también ha sido estudiado, siendo uno de los factores en la activación del NFκB, generándose un aumento de la actividad osteoclástica a nivel periodontal (75,78). Huang *et al.*, (75) realizaron un estudio experimental en un modelo murino, generando lesiones periodontales con ligaduras en el ligamento periodontal y pautando una dieta con alto contenido en grasa y con bajo contenido en grasa. Tras las 16 semanas evaluaron la pérdida ósea radiográfica por medio de una CAT, y concluyeron que los ratones del modelo con periodontitis presentaron pérdida de hueso y dicha pérdida se correspondía con elevados niveles NLRP3 y MCP1 en los tejidos periodontales (determinados con inmunohistoquímica y PCR cuantitativa en los tejidos periodontales). También constataron que la obesidad (en el grupo de ratones obesos) disminuía la expresión del NLRP3 en los tejidos periodontales, actuando como un factor inhibidor de la inmunidad innata y, en consecuencia, aumentando la severidad de las lesiones periodontales. La activación del inflammasoma fue mayor en aquellos ratones en los que se infectó el GFC con el LPS de *Porphyromona gingivalis*.

Yamaguchi *et al.*, (77) encontraron resultados similares en un modelo murino knockout de NLRP3, en los que se había estimulado la respuesta inmune a nivel periodontal introduciendo *Porphyromona gingivalis* en saliva. El grupo control de ratones mostró altos niveles de reabsorción ósea, resultado de la activación del RANKL, aumento de la producción de IL1β, IL18 e IL6; y de la actividad de caspasa-1 en macrófagos. Sin embargo, los ratones con deficiencia de NLRP3 no presentaron pérdida ósea tras la aplicación de la bacteria en saliva; lo que sugiere que la actividad innata mediada por el NLRP3 es fundamental en el proceso de activación del RANKL en la activación ósea.

Recientemente, Isaza-Guzmán *et al.*, (76) cuantificaron los niveles en saliva del NLRP3, ASC, la caspasa 1 y la IL1β en pacientes con periodontitis (de rápida evolución y crónicas) y controles. Se detectaron niveles significativamente más altos de NLRP3, ASC e IL1β en los grupos de periodontitis comparados con los

controles. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas para los niveles de caspasa-1 entre los grupos clínicos, y solo la concentración salival de NLRP3 fue significativamente mayor en los pacientes con periodontitis de rápida evolución (agresivas) en comparación con los pacientes con periodontitis de crónicas. Además, las concentraciones salivales de NLRP3, ASC e IL1 β fueron proporcionales al empeoramiento de los parámetros clínicos periodontales.

Para que se produzca el ensamblaje de los complejos proteicos formadores del NLRP3, se requiere la fosforilación del NLRP3 y de la proteína adaptadora ASC. Dentro de las MAPK, la proteína JNK tienen funciones importantes en la regulación de las respuestas inflamatorias e inmunitarias, como es la fosforilación de la proteína adaptadora ASC (necesaria para la formación de agregados proteicos de ASC) (41).

Cuando cuantificamos los niveles proteicos de JNK y NF κ B en los leucocitos, encontramos niveles significativamente mayores de ambas proteínas, en el grupo PCOS con gingivitis. Concretamente, identificamos una correlación significativa positiva entre la JNK y el BOP, que se correspondió con una regresión lineal simple significativa con el BOP y con la presencia de gingivitis. Por lo tanto, nuestros resultados están en la línea de otros autores en los que se muestra como el inflamasoma NLRP3 puede modular la respuesta inflamatoria de los tejidos periodontales ante las agresiones bacterianas, en detrimento de la salud gingival (75–78) aunque van un paso más allá, ya que en la presente Tesis Doctoral, hemos analizado la expresión en leucocitos de sangre periférica, lo que sugiere que la presencia de gingivitis es capaz de activar la formación de complejo del inflamasoma no solo a nivel periodontal sino también a nivel sistémico.

El aumento de los periodontopatógenos que generan LPS, involucra a los receptores tipo TLR que conducen a la activación del NF κ B responsable de la transcripción de genes de citoquinas proinflamatorias como TNF α o IL1 β (mediante la activación del complejo del inflamasoma) (79). Asimismo, el fibroblasto gingival estimulado por LPS de los periodontopatógenos como la *Porphyromona gingivalis* mostró en investigaciones recientes (79,80) una producción de TNF α dependiente de NF κ B que condujo a un proceso

inflamatorio que involucró la activación de ERK, p38 y JNK, así como la expresión de PAI1. Dado que nuestro estudio no realizó recuentos bacterianos, el planteamiento de la activación directa del inflamasoma NLRP3 por medio de los periodontopatógenos no es posible. Sin embargo, puesto que el empeoramiento del BOP fue proporcional al aumento de los niveles de JNK y NFκB en PBMCs (monocitos y linfocitos), nos hace pensar en que ha existido la activación de la inmunidad innata por las bacterias periodontales presentes en el surco gingival, causando una mayor inflamación gingival.

La MCP1, implicada en el reclutamiento de leucocitos, fue significativamente más alta en el grupo PCOS con gingivitis, comparado con las pacientes PCOS periodontalmente sanas y el grupo control. Además, se correspondió con valores significativamente mayores de BOP. Otros autores, también han encontrado una relación entre los niveles de MCP1 y el empeoramiento de los parámetros periodontales, siendo esta asociación más relevante conforme aumenta el BMI (75,81–83). Esta proteína es secretada por diferentes tipos celulares, entre los que destacan las células endoteliales, los macrófagos y los propios monocitos. Además, se ha relacionado con el aumento del tejido adiposo y el hirsutismo en PCOS y sus niveles parecen no variar con la administración oral de sensibilizadores de insulina (84). La MCP1 se emplea como biomarcador en inicio y progresión de la periodontitis, dado que la mejora de los parámetros periodontales tras el tratamiento periodontal, parece asociarse a la reducción de los niveles de MCP1 tanto en GCF como en suero (81). Tanto en las recientes investigaciones (75,81–83) como en nuestro estudio, la asociación entre los niveles de MCP1 y el BOP, plantea una tendencia de las pacientes PCOS con gingivitis a un estado proinflamatorio local, que se corresponde con la cuantificación de dichas proteínas a nivel sistémico.

Otro aspecto a considerar sobre las repercusiones sistémicas de las PDs, es el efecto de estas sobre el endotelio. El endotelio, regulador de las funciones de la pared vascular y de las relaciones de estas con las células circulantes, presenta importantes funciones en la regulación de la homeostasis vascular. Cuando se altera las funciones del endotelio y se pierde el rol homeostático de éste, se presenta una situación de disfunción endotelial. Los procesos infecciosos e

inflamatorios como las PDs se asocian a disfunción endotelial (37,57,85–88). Tonetti *et al.*, (61) realizaron una revisión exhaustiva de los ensayos clínicos disponibles para determinar cómo podían influir las PDs en el desarrollo de las enfermedades CV y la disfunción endotelial. Aunque no consigue dilucidar los mecanismos moleculares exactos implicados en dicha asociación, llega a la conclusión de que el tratamiento periodontal de las PDs mejora la función endotelial y reduce la inflamación sistémica. Estos resultados coinciden con los publicados más tarde en el “Consensus Report” por Sanz *et al.*, (87) en la revista *Journal of Periodontology* en la que los expertos afirman que la literatura científica establece que los pacientes con periodontitis presentan mayor riesgo de infarto y fibrilación auricular. Además, destacan la importancia de los periodontopatógenos en la formación de placas de ateroma, la activación del inflammasoma y la disfunción endotelial.

De igual manera, el PCOS se ha asociado a alteraciones de la función endotelial y el consecuente aumento de riesgo CV (7,63,69,89,90). Los resultados de la presente Tesis Doctoral indican que las pacientes PCOS con gingivitis presentaron mayor flujo de rodamiento y adhesión de neutrófilos, y una reducción de la velocidad de rodamiento de los neutrófilos, comparado con las PCOS periodontalmente sanas y con los controles periodontalmente sanas. Este empeoramiento de los parámetros de las interacciones leucocito-endotelio resulta sorprendente, dado que hasta ahora a la gingivitis no se la había relacionado con la hiperreactividad de los neutrófilos procedentes de pacientes PCOS. Que exista esta tendencia hacia la disfunción endotelial en una etapa temprana de las PDs como es la gingivitis, en la que todavía no ha habido destrucción ósea y que presenta la posibilidad de curación, evidencia la relevancia del tratamiento de las patologías periodontales incluso en los estadios iniciales.

Curiosamente, el aumento del BOP se correlacionó con un mayor flujo de rodamiento de los neutrófilos, una mayor adhesión y una menor velocidad de flujo. Nuestro grupo de investigación publicó en 2018 (37), una investigación en la revista *Journal of Clinical Periodontology* en la que encontramos esta hiperreactividad en los leucocitos de pacientes obesos con periodontitis. Además, también determinamos como esta hiperreactividad era directamente

proporcional al empeoramiento de cada uno de los parámetros periodontales (BOP, CAL y PPD) y se asociaba con una mayor severidad de la periodontitis. Asimismo, nuestro grupo de investigación también demostró como las pacientes con PCOS (con y sin Síndrome Metabólico) mostraron una mayor adhesión y flujo de rodamiento y una menor velocidad de rodamiento de los leucocitos, comparado con sus respectivos controles (7,57). De igual manera, los hallazgos indicaron que aquellas pacientes PCOS con IR, presentaron un empeoramiento de los parámetros de la función endotelial y mayores niveles de moléculas de adhesión solubles (sICAM y sVCAM), aumentando así el riesgo CV (7,57); coincidiendo con otros autores que vincularon la IR con un empeoramiento de la función endotelial (2,37,69,91,92).

Además de la inflamación gingival, cuya correlación con los parámetros de la interacción leucocito-endotelio fue bastante potente, nuestros resultados mostraron una correlación negativa, aunque más débil, de la velocidad de rodamiento con los niveles de insulina, triglicéridos, C3, RBP4 y CRP. Curiosamente, tanto la RBP4 como la CRP han sido identificadas como posibles biomarcadores de periodontitis, por estar relacionadas con la severidad de la afectación periodontal (34,36,37,62,64–66). De esta forma, podemos observar cómo, aunque las correlaciones fueron bajas, se observa una tendencia al empeoramiento de la función endotelial conforme aumentan los niveles de insulina.

Para complementar la determinación de la función endotelial, cuantificamos en suero las moléculas de adhesión sICAM y sVCAM y cuyos niveles se relacionan con el riesgo CV. Uno de las primeras etapas de la aterogénesis es la adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio y la posterior migración a través de este (93–95). La expresión de las moléculas de adhesión en un endotelio que conserva su función normal es baja. Los estímulos aterogénicos como las citoquinas proinflamatorias y los ROS, que se encuentran aumentados en las PDs (especialmente en la periodontitis), se han relacionado con el aumento de las ICAM y VCAM (57,96).

De igual manera, la expresión de estas moléculas también se encuentran elevadas en pacientes con IR y obesidad (7,57,83). En esta Tesis Doctoral, los

niveles de sICAM en suero fueron significativamente más altas en el grupo PCOS con gingivitis, comparado con el grupo PCOS periodontalmente sanas y el grupo control. Además, la molécula de adhesión sICAM se correlacionó positivamente con el BOP, cuya regresión lineal simple fue estadísticamente significativa, y con la insulina, los triglicéridos y C3, mientras que con el HDLc mostró una correlación negativa. Estos resultados, sugieren que los niveles de sICAM se encuentran afectados por parámetros inflamatorios periodontales, IR y dislipemia.

Para concluir, en el desarrollo de la presente Tesis Doctoral hemos encontrado un peor estado periodontal en las pacientes con PCOS. Este empeoramiento podría deberse al efecto de terceras variables que aumentan la susceptibilidad que tiene las pacientes PCOS ante el desarrollo de las PDs. Una de los parámetros más destacados, tanto en esta investigación como en los restantes estudios analizados, es el efecto de la insulina (incluido el HOMA) sobre los tejidos periodontales y la alteración del perfil lipídico (comúnmente asociada al sobrepeso y la obesidad). Hasta ahora, la asociación de la periodontitis y la disfunción endotelial (mediada por el aumento de las citoquinas proinflamatorias, el aumento de los ROS y la consecuente hiperreactividad de los leucocitos) había sido planteada en periodontitis de larga evolución (crónicas). La gingivitis no había sido asociada a la disfunción endotelial y en consecuencia al aumento del riesgo CV. Asimismo, la cuantificación sistémica de citoquinas proinflamatorias y de las proteínas involucradas en la activación del complejo del inflammasoma NLRP3 tampoco se habían detectado en un grupo de pacientes PCOS con gingivitis. Por ello, serían necesarias futuras investigaciones que abran nuevas líneas de investigación centradas en las rutas moleculares que podrían estar asociando el mayor riesgo CV a las PDs en pacientes PCOS.

Limitaciones y fortalezas del estudio

En cuanto a las limitaciones del estudio, podemos observar como al tratarse de una investigación con un diseño retrospectivo (de casos y controles) no es posible buscar asociaciones que establezcan causalidad, aunque con esta metodología es posible estimar la asociación del PCOS con las PDs por medio de la OR indicando la fortaleza de la asociación y la probabilidad de que ocurra esta patología en el grupo PCOS.

Además, al no haberse realizado un análisis microbiológico de la saliva, no es posible estudiar los cambios en la microflora oral y de esta forma identificar si existen cambios relevantes en las pacientes PCOS que podrían contribuir a la mayor prevalencia de gingivitis encontrada en ellas. Sin embargo, al complementar la exploración periodontal y el estudio radiográfico con las determinaciones bioquímicas, las hormonas sexuales y la cuantificación de proteínas proinflamatorias a nivel sistémico, obtuvimos una información detallada del estado proinflamatorio sistémico de las pacientes, completando así el estudio.

Por otro lado, dentro de los puntos fuertes de esta investigación, es importante destacar que en los experimentos empleamos las últimas técnicas disponibles para la determinación de las citoquinas proinflamatorias como es la tecnología X-MAP de Luminex® 200. La determinación de los parámetros de disfunción endotelial y las moléculas de adhesión endotelial, no han sido publicadas a día de hoy en un grupo PCOS junto con el diagnóstico periodontal de las pacientes. Asimismo, al realizarse el diagnóstico periodontal atendiendo a la última clasificación de las PDs (que minimiza la sobreestimación de la prevalencia de PDs) y siendo realizada por un único odontólogo, se redujeron las posibilidades de variabilidad en la determinación del diagnóstico periodontal.

Además, aunque existan estudios que realicen exploración clínica y determinaciones de citoquinas proinflamatorias en pacientes con PCOS, estas suelen realizarse solo sobre el GCFO saliva, pero no emplean determinaciones detalladas de los neutrófilos, linfocitos y monocitos. Por ello, podemos decir que hasta ahora no hemos encontrado ninguna investigación que contemple la

exploración periodontal completa y la determinación sistémica de proteínas junto al estudio de la función endotelial y la cuantificación de proteínas implicadas en la activación del inflamasoma NLRP3 en los PBMCs. De igual manera, el hecho de haber realizado la determinación de los parámetros bioquímicos y hormas sexuales implicados en las manifestaciones clínicas del PCOS, nos permitió estudiar la influencia de estos parámetros como terceras variables (variables confusoras) en la asociación de las PDs con el PCOS.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Tras realizar el diagnóstico periodontal de las pacientes con el Síndrome de Ovario Poliquístico (PCOS), encontramos una mayor prevalencia de enfermedades periodontales (PDs) en el grupo PCOS comparado con el grupo control.

Como conclusiones de los objetivos específicos podemos decir que:

1. El grupo PCOS mostró una probabilidad 5,72 veces mayor de padecer gingivitis comparado con el grupo control. La inflamación gingival, determinada con el porcentaje de sangrado al sondaje (BOP) y el número de dientes con pérdida de inserción clínica ≥ 4 mm (CAL ≥ 4 mm) fueron significativamente mayores en el grupo PCOS.
2. Ambos grupos (PCOS y control) mostraron buenos hábitos de higiene oral, un bajo porcentaje de fumadoras y un bajo consumo de alcohol, sin encontrarse diferencias significativas entre ellos. La frecuencia de cepillado dental inferior de una vez al día mostró una mayor prevalencia de PDs, comparado con aquellas pacientes que registraron un cepillado dental de al menos 2 veces al día. La frecuencia baja de los hábitos tóxicos podría explicar que no se asociaran a una mayor prevalencia de PDs en ninguno de los grupos.
3. El grupo PCOS registró la toma de anticonceptivos orales (OC) en mayor frecuencia que el grupo control, de forma estadísticamente significativa. La toma de dichos fármacos se asoció a una mayor prevalencia de PDs, pero sin alterar los valores promedio de los parámetros periodontales (BOL, CAL y PPD). La toma de metformina no se asoció a cambios en el estado periodontal lo que podría deberse al bajo número de pacientes que la tomaron.

4. El grupo PCOS mostró valores significativamente más altos de los parámetros antropométricos comparado con el grupo control que mostraron una asociación estadísticamente significativa con las PDs. Concretamente, el aumento del índice de masa corporal (BMI) se correspondió con el empeoramiento de todos los parámetros periodontales, siendo uno de los factores que podrían contribuir en el aumento de la probabilidad de padecer PDs encontrado en el grupo PCOS. La insulina y la alteración del perfil lipídico (con el aumento de LDLc y triglicéridos y la disminución del HDLc) se asociaron con un peor estado periodontal, siendo esta asociación estadísticamente significativa en el grupo PCOS. El estradiol y la 17OH-progesterona fueron significativamente menores en el grupo PCOS comparado con el grupo control, pudiendo deberse a la toma de anticonceptivos orales. Ninguna de las hormonas sexuales, se asoció a una mayor prevalencia de PDs, ni a la alteración de los parámetros periodontales (tanto en el grupo PCOS como en el control).
5. El perfil inflamatorio determinado a nivel sistémico mostró valores significativamente mayores de interleuquina 6 (IL6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) y mieloperoxidasa (MPO) en las pacientes con PCOS (periodontalmente sanas y con gingivitis) comparado con las controles. Además, las proteínas implicadas en la activación del inflamasoma NLRP3 - JNK y NF κ B, así como la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP1), todas ellas determinadas en PBMCs, fueron significativamente más altas en el grupo PCOS con gingivitis, comparado con las PCOS periodontalmente sanas y las controles, lo que sugiere una activación de la respuesta inflamatoria en las pacientes PCOS con gingivitis comparada con las pacientes PCOS periodontalmente sanas y las controles.
6. La presencia de gingivitis se asoció a un aumento de las interacciones leucocito-endotelio y de la expresión de la molécula de adhesión endotelial intercelular soluble (sICAM) en el grupo PCOS. Más concretamente, el grupo PCOS con gingivitis mostró valores significativamente mayores de adhesión de neutrófilos al endotelio, mayor

flujo de rodamiento de los neutrófilos y menor velocidad de rodamiento de los neutrófilos, comparado con el grupo PCOS periodontalmente sanas y el grupo control. De esta forma, podemos observar como existió una hiperreactividad de los neutrófilos en las pacientes PCOS con gingivitis, marcando una tendencia hacia la disfunción endotelial y el riesgo cardiovascular, comparado con las pacientes PCOS periodontalmente sanas y las controles.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Khosravi R, Ka K, Huang T, Khalili S, Nguyen BH, Nicolau B, et al. Tumor necrosis factor- α and interleukin-6: potential interorgan inflammatory mediators contributing to destructive periodontal disease in obesity or metabolic syndrome. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:728987.
2. Bravo Pérez M. Epidemiología de las enfermedades gingivo-periodontales. *RCOE.* 2018; 23: 6-8.
3. Pérez BM, Silla AJ, Márquez A V, Gutiérrez AP, González BJ, Díaz CE, et al. Encuesta de Salud Oral en España 2015. 2016;21(1):8-48.
4. Borrell LN, Papapanou PN. Analytical epidemiology of periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32:132–58.
5. SEPA. Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración. Las enfermedades periodontales en España. 2010;56:1-20.
6. Escudero-Castaño N, Perea-García MA, Bascones-Martínez A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av en Periodoncia e Implanol Oral.* 2008;20(1):29–34.
7. Oppermann RV, Weidlich P, Musskopf ML. Periodontal disease and systemic complications. 2012; 39–47.
8. Rénatus A. Evaluation of an Electronic Periodontal Probe Versus a Manual Probe. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;10(11):3–7.
9. Uriarte SM, Edmisson JS, Jimenez-Flores E. Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence. *Immunol Rev.* 2016;273(1):282–98.
10. Hajishengallis G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol Oral Microbiol.* 2014;29(6):248–57.
11. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet.* 2005;366(9499):1809–20.
12. Tsai CY, Tang CY, Tan TS, Chen KH, Liao KH, Liou ML. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *J Microbiol Immunol Infect.* 2016;51(2):226-234.
13. Trombelli L, Farina R, Silva CO, Tatakis DN. Plaque-induced gingivitis: Case definition and diagnostic considerations. *J Periodontol.* 2018;89(1):S46–73.
14. Goodson JM. Disease reciprocity between gingivitis and obesity. *J Periodontol* 2020;91(1):S26–34.
15. Trombelli L, Farina R. A review of factors influencing the incidence and severity of plaque-induced gingivitis. *Minerva Stomatol.* 2013;62(6):207–34.
16. Özçaka Ö, Buduneli N, Ceyhan BO, Akcali A, Hannah V, Nile C, et al. Is Interleukin-17 Involved in the Interaction Between Polycystic Ovary Syndrome and Gingival Inflammation? *J Periodontol.* 2013;84(12):1827–37.

17. Terashima T, Chubachi S, Matsuzaki T, Nakajima T, Satoh M, Iwami E, et al. The association between dental health and nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease. *Chron Respir Dis*. 2017;14(4):334–41.
18. Bilińska M, Sokalski J. Pregnancy gingivitis and tumor gravidarum. *Ginekol Pol*. 2016;87(4):310–3.
19. Wu M, Chen SW, Jiang SY. Relationship between gingival inflammation and pregnancy. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:623427.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología Básica: Funciones y trastornos del sistema inmunitario*. 5a. Elsevier Inc.; 2017. p10–60.
21. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Inmunología celular y molecular*. 10a. Elsevier; 2022. p 1–65.
22. Watanabe K, Cho YD. Periodontal disease and metabolic syndrome: A qualitative critical review of their association. *Arch Oral Biol*. 2014;59(8):855–70.
23. Blasco-Baque V, Garidou L, Pomié C, Escoula Q, Loubieres P, Le Gall-David S, et al. Periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis* drives periodontal microbiota dysbiosis and insulin resistance via an impaired adaptive immune response. *Gut*. 2017;66(5):872–85.
24. Sayeed G, Varghese S. Association Between Periodontitis and Metabolic Syndrome in Females: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2021;11(6):609–25.
25. Gobin R, Tian D, Liu Q, Wang J. Periodontal Diseases and the Risk of Metabolic Syndrome: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Endocrinol*. 2020;11:336.
26. Nibali L, Tatarakis N, Needleman I, Tu YK, D’Aiuto F, Rizzo M, et al. Association between metabolic syndrome and periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(3):913–20.
27. Martinez-Herrera M, Silvestre-Rangil J, Silvestre FJ. Association between obesity and periodontal disease. A systematic review of epidemiological studies and controlled clinical trials. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2017;22(6):e708.
28. Martinez-Herrera M, Silvestre FJ, Silvestre-Rangil J, Bañuls C, Rocha M, Hernández-Mijares A. Involvement of insulin resistance in normoglycaemic obese patients with periodontitis: A cross-sectional study. 2017;44(10):981–8.
29. Dursun E, Akalın FA, Güncü GN, Çnar N, Aksoy DY, Tözüm TF, et al. Periodontal disease in polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2011;95(1):320–3.
30. Tanguturi S, Nagarakanti S. Polycystic ovary syndrome and periodontal disease: Underlying links- A review. *Indian J Endocrinol Metab*. 2018;22(2):267.
31. Broughton DE, Moley KH. Obesity and female infertility: potential mediators of obesity’s impact. *Fertil Steril*. 2017;107(4):840–7.

32. Márquez-Arrico CF, Silvestre-Rangil J, Gutiérrez-Castillo L, Martínez-Herrera M, Silvestre FJ, Rocha M. Association between Periodontal Diseases and Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review. *J Clin Med*. 2020;9(5):1586.
33. Kellesarian SV, Malignaggi VR, Kellesarian TV, Al-Kheraif AA, Alwageet MM, Malmstrom H, et al. Association between periodontal disease and polycystic ovary syndrome: a systematic review. *Int J Impot Res*. 2017;29(3):89–95.
34. Bartold PM, Lopez-Oliva I. Periodontitis and rheumatoid arthritis: An update 2012-2017. *Periodontol 2000*. 2020;83(1):189–212.
35. Sanz M, Marco del Castillo A, Jepsen S, Gonzalez-Juanatey JR, D’Aiuto F, Bouchard P, et al. Periodontitis and cardiovascular diseases: Consensus report. *J Clin Periodontol*. 2020;47(3):268–88.
36. Linden GJ, Lyons A, Scannapieco FA. Periodontal systemic associations: Review of the evidence. *J Clin Periodontol*. 2013;40(14):8–19.
37. Hamasni FM, Hajj F El. Comparison of the Clinical Biological Width with the Published Standard Histologic Mean Values. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2017;7(5):264–71.
38. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S9–16.
39. Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. 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. In: *Journal of Clinical Periodontology*. 2018;45(20):S68-S77.
40. Holmstrup P, Plemons J, Meyle J. Non-plaque-induced gingival diseases. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S28–43.
41. Palacios-Sánchez B, Cerero-Lapiedra R, Campo-Trapero J, Esparza-Gómez GC. Alteraciones gingivales no relacionadas con placa. *RCOE*. 2006;11:43–55.
42. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol*. 1999;4(1):1-6.
43. Papapanou PN, Sanz M, Buduneli N, Dietrich T, Feres M, Fine DH, et al. Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. 2018;89:S173–82.
44. Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. *J Clin Periodontol*. 2018;45:S78–94.
45. Patel J, Woolley J. Necrotizing periodontal disease: Oral manifestation of COVID-19. *Oral Dis*. 2021;27(S3):768–9.
46. Jepsen S, Caton JG, Albandar JM, Bissada NF, Bouchard P, Cortellini P, et al. Periodontal manifestations of systemic diseases and developmental and acquired conditions: Consensus report of workgroup 3 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. *J Periodontol*. 2018;89:S237–48.

47. Meyle J, Chapple I. Molecular aspects of the pathogenesis of periodontitis. *Periodontol* 2000. 2015;69(1):7–17.
48. Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013;62(1):59–94
49. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005 ;366(9499):1809–20.
50. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *J Periodontol*. 2005;76(11):2075–84.
51. Simpson TC, Clarkson JE, Worthington HV, MacDonald L, Weldon JC, Needleman I, et al. Treatment of periodontitis for glycaemic control in people with diabetes mellitus. *Cochrane database Syst Rev*. 2022;4(4):CD004714.
52. Souza dos Santos AC, Soares NP, Costa EC, de Sá JCF, Azevedo GD, Lemos TMAM. The impact of body mass on inflammatory markers and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Gynecol Endocrinol*. 2015;31(3):225–8.
53. Martínez-Herrera M, López-Domènech S, Silvestre FJ, Silvestre-Rangil J, Bañuls C, Victor VM, et al. Chronic periodontitis impairs polymorphonuclear leucocyte–endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *J Clin Periodontol*. 2018;45(12):1429–39.
54. Porwal S, Tewari S, Sharma RK, Singhal SR, Narula SC. Periodontal Status and High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Polycystic Ovary Syndrome With and Without Medical Treatment. *J Periodontol*. 2014;85(10):1380-9.
55. Lim SG, Han K, Kim HA, Pyo SW, Cho YS, Kim KS, et al. Association between insulin resistance and periodontitis in Korean adults. *J Clin Periodontol*. 2014;41(2):121–30.
56. Noguera-Julian M, Guillén Y, Peterson J, Reznik D, Harris EV, Joseph SJ, et al. Oral microbiome in HIV-associated periodontitis. *Medicine*. 2017;96(12):e5821.
57. Xia YH, Yao L, Zhang ZX. Correlation between IL-1 β , IL-1Ra gene polymorphism and occurrence of polycystic ovary syndrome infertility. *Asian Pac J Trop Med*. 2013;6(3):232–6.
58. Kriauciunas A, Zekonis G, Liutkeviciene R. Periodontitis association with IL-8 gene polymorphisms. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2022;166(1):28–39.
59. Stolf CS, Sacramento CM, Paz HES, Machado RA, Ramos LP, de Oliveira LD, et al. IL10 promoter rs6667202 polymorphism is functional in health but not in grade c periodontitis patients: A pilot study. *J Periodontal Res*. 2022;57(1):85–93.
60. Sasi-Kumar PK, Sheeja-Varghese S, Kumaran T, Jaga-Desaan N, Lambo Daran G. Association of IL-17A Polymorphism with Chronic Periodontitis in Type 1 Diabetic Patients. *J Dent*. 2021;22(3):180–6.
61. Luan X, Zhou X, Fallah P, Pandya M, Lyu H, Foyle D, et al. MicroRNAs: Harbingers and shapers of periodontal inflammation. *Semin Cell Dev Biol*. 2022;124:85–98.

62. Munde EO, Okeyo WA, Raballah E, Anyona SB, Were T, Ong'echa JM, et al. Association between Fcγ receptor IIA, IIIA and IIIB genetic polymorphisms and susceptibility to severe malaria anemia in children in western Kenya. *BMC Infect Dis.* 2017;17(1):289.
63. Hans VM, Mehta DS. Genetic polymorphism of Fcγ-receptors IIa, IIIa and IIIb in South Indian patients with generalized aggressive periodontitis. *J Oral Sci.* 2011;53(4):467–74.
64. Hans VM, Mehta DS, Hans M. Association of Fc gamma-receptors IIa, IIIa, and IIIb genetic polymorphism with susceptibility to chronic periodontitis in South Indian population. *Contemp Clin Dent.* 2015;6(1):S141–6.
65. de Souza RC, Colombo AP V. Distribution of FcγRIIa and FcγRIIIb Genotypes in Patients With Generalized Aggressive Periodontitis. *J Periodontol.* 2006;77(7):1120–8.
66. Liu X, Li H. A Systematic Review and Meta-Analysis on Multiple Cytokine Gene Polymorphisms in the Pathogenesis of Periodontitis. *Front Immunol.* 2022;3;12:713198.
67. Mehar R, Swarnakar S, Lakkakula S, Verma HK, Bhaskar LVKS. Interleukin-6 gene -174G>C promoter polymorphism reduces the risk of periodontitis in Brazilian populations: A meta-analysis. *J oral Biosci.* 2021;63(4):388–93.
68. Gorgun E, Toker H, Tas A, Alpan A, Sari I, Silig Y. IL-13 gene polymorphisms (-1112 C/T and -1512 A/C) in patients with chronic and aggressive periodontitis: Effects on GCF and outcome of periodontal therapy. *Niger J Clin Pract.* 2021;24(7):965–72.
69. Dimou NL, Nikolopoulos GK, Hamodrakas SJ, Bagos PG. Fcγ receptor polymorphisms and their association with periodontal disease: A meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2010;37(3):255–65.
70. Chen L, Li H, Zhang P, Wang S. Association Between Vitamin D Receptor Polymorphisms and Periodontitis: A Meta-Analysis. *J Periodontol.* 2012;83(9):1095–103.
71. Öztürk A, Ada AO. The roles of ANRIL polymorphisms in periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig.* 2022;26(2):1121–35.
72. Taiete T, Casati MZ, Stolf CS, Corrêa MG, Santamaria MP, Andere NMRB, et al. Validation of reported GLT6D1 (Rs1537415), IL10 (rs6667202), and ANRIL (rs1333048) single nucleotide polymorphisms for aggressive periodontitis in a Brazilian population. *J Periodontol.* 2019;90(1):44–51.
73. Loo WTY, Jin L, Cheung MNB, Wang M, Chow LWC. Epigenetic change in E-cadherin and COX-2 to predict chronic periodontitis. *J Transl Med.* 2010;4;8:110.
74. Zhang Z shan. Association between COX2 -765G/C polymorphism and periodontitis in Chinese population: a meta-analysis. *BMC Oral Health.* 2018;18(1)32.
75. Shao J, Zhang M, Wu L, Jia XW, Jin YH, Zeng XT. DEFB1rs11362 polymorphism and risk of chronic periodontitis: A meta-analysis of unadjusted and adjusted data. *Front Genet.* 2019;10:179.
76. Xin M, Hao L, Chou H. Correlation of DEFB1 polymorphisms with chronic periodontitis in Henan Han population. *Chinese J Med Genet.* 2019;36(4):371–5.
77. Zhong S, Wang C, Gao R, Shu S, Shu C. Association between DEFB1 polymorphisms and periodontitis: a meta-analysis. *Pharmazie.* 2019;74(7):390–6.

78. Kebschull M, Papapanou PN. Mini but Mighty - microRNAs in the Pathobiology of Periodontal Disease. *Periodontol 2000*. 2015;69(1):201.
79. Micó-Martínez P, Almiñana-Pastor PJ, Alpiste-Illueca F, López-Roldán A. MicroRNAs and periodontal disease: a qualitative systematic review of human studies. *J Periodontal Implant Sci*. 2021;51(6):1–12.
80. Abdullatif FA, Almaarik B, Al-Askar M. Resolvin E1's Antimicrobial Potential Against *Aggregatibacter Actinomycetemcomitans*. *Front oral Heal*. 2022;3:875047.
81. Wzatek M, Bahammam S, Buiga P, Haddad K, Sima C. Oral Neutrophil Free Fatty Acid Receptors Expression May Link Oral Host and Microbiome Lipid Metabolism. *Front oral Heal*. 2022;3:821326.
82. Albuquerque-Souza E, Schulte F, Chen T, Hardt M, Hasturk H, Van Dyke TE, et al. Maresin-1 and Resolvin E1 Promote Regenerative Properties of Periodontal Ligament Stem Cells Under Inflammatory Conditions. *Front Immunol*. 2020;11:585530.
83. Hasturk H, Abdallah R, Kantarci A, Nguyen D, Giordano N, Hamilton J, et al. Resolvin E1 Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation in Diet and Inflammation Induced Atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(5):1123.
84. Lee CT, Teles R, Kantarci A, Chen T, McCafferty J, Starr JR, et al. Resolvin E1 Reverses Experimental Periodontitis and Dysbiosis. *J Immunol*. 2016;197(7):2796.
85. Page RC, Kornman KS. The pathogenesis of human periodontitis: an introduction. *Periodontol 2000*. 1997;14:9–11.
86. Nisha KJ, Suresh A, Anilkumar A, Padmanabhan S. MIP-1 α and MCP-1 as salivary biomarkers in periodontal disease. *Saudi Dent J*. 2018;30(4):292.
87. Gupta M, Chaturvedi R, Jain A. Role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) as an immune-diagnostic biomarker in the pathogenesis of chronic periodontal disease. *Cytokine*. 2013;61(3):892–7.
88. Akcalı A, Bostanci N, Özçaka Ö, Gümüş P, Öztürk-Ceyhan B, Tervahartiala T, et al. Gingival Inflammation and Salivary or Serum Granulocyte-Secreted Enzymes in Patients With Polycystic Ovary Syndrome. *J Periodontol*. 2017;88(11):1145–52.
89. Victor VM, Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, Martinez de Marañon A, Rios-Navarro C, et al. Insulin Resistance in PCOS Patients Enhances Oxidative Stress and Leukocyte Adhesion: Role of Myeloperoxidase. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151960.
90. Schenkein HA, Papapanou PN, Genco R, Sanz M. Mechanisms underlying the association between periodontitis and atherosclerotic disease. *Periodontol 2000*. 2020;83(1):90–106.
91. Moura MF, Navarro TP, Silva TA, Cota LOM, Soares Dutra Oliveira AM, Costa FO. Periodontitis and Endothelial Dysfunction: Periodontal Clinical Parameters and Levels of Salivary Markers Interleukin-1 β , Tumor Necrosis Factor- α , Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-2 Complex, and Nitric Oxide. *J Periodontol*. 2017;88(8):778–87.
92. Akcall A, Bostanci N, Özçaka Ö, Öztürk-Ceyhan B, Gümüş P, Tervahartiala T, et al. Elevated matrix metalloproteinase-8 in saliva and serum in polycystic ovary syndrome and association with gingival inflammation. *Innate Immun*. 2015;21(6):619–25.

93. Kiel IA, Jones H, Moholdt T, Lionett S, RøsbjØrgen R, Lydersen S, et al. Cardiovascular Health Does Not Change Following High-Intensity Interval Training in Women with Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Med*. 2022;11(6):1626.
94. Podmore M, Ebersole JL, Kinane DF. Immunodominant antigens in periodontal disease: a real or illusive concept? *Crit Rev Oral Biol Med*. 2001;12(2):179–85.
95. Becerra Ruiz JS, Guzman Flores JM. Enfermedad periodontal y sistema inmune. *Elem 123*. 2021;51–4.
96. Vezza T, de Marañón AM, Canet F, Díaz-Pozo P, Marti M, D'ocon P, et al. MicroRNAs and Oxidative Stress: An Intriguing Crosstalk to Be Exploited in the Management of Type 2 Diabetes. *Antioxidants*. 2021;10(5):802.
97. Rocha M, Apostolova N, Diaz-Rua R, Muntane J, Victor VM. Mitochondria and T2D: Role of Autophagy, ER Stress, and Inflammasome. *Trends Endocrinol Metab*. 2020;31(10):725–41.
98. Rathinam VAK, Vanaja SK, Fitzgerald KA. Regulation of inflammasome signaling. *Nat Immunol*. 2012;13(4):333–42.
99. Jimi E, Takakura N, Hiura F, Nakamura I, Hirata-Tsuchiya S. The Role of NF-κB in Physiological Bone Development and Inflammatory Bone Diseases: Is NF-κB Inhibition “Killing Two Birds with One Stone”? *Cells*. 2019;8(12):1636.
100. Becerik S, Öztürk VÖ, Atmaca H, Atilla G, Emingil G. Gingival Crevicular Fluid and Plasma Acute-Phase Cytokine Levels in Different Periodontal Diseases. *J Periodontol*. 2012;83(10):1304–13.
101. Isaza-Guzmán DM, Medina-Piedrahíta VM, Gutiérrez-Henao C, Tobón-Arroyave SI. Salivary Levels of NLRP3 Inflammasome-Related Proteins as Potential Biomarkers of Periodontal Clinical Status. *J Periodontol*. 2017;88(12):1329–38.
102. Yamaguchi Y, Kurita-Ochiai T, Kobayashi R, Suzuki T, Ando T. Regulation of the NLRP3 inflammasome in *Porphyromonas gingivalis*-accelerated periodontal disease. *Inflamm Res*. 2017;66(1):59–65.
103. Belibasakis GN, Johansson A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* targets NLRP3 and NLRP6 inflammasome expression in human mononuclear leukocytes. *Cytokine*. 2012;59(1):124–30.
104. Martínez-Herrera M, Abad-Jiménez Z, Silvestre FJ, López-Domènech S, Márquez-Arrico CF, Silvestre-Rangil J, et al. Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Oxidative Stress Markers in Leukocytes and Their Interaction with the Endothelium in Obese Subjects with Periodontitis: A Pilot Study. *J Clin Med*. 2020;9(7):1–16.
105. Duică F, Dănilă CA, Boboc AE, Antoniadis P, Condrat CE, Onciul S, et al. Impact of Increased Oxidative Stress on Cardiovascular Diseases in Women With Polycystic Ovary Syndrome. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:614679.
106. D'Aiuto F, Nibali L, Parkar M, Patel K, Suvan J, Donos N. Oxidative Stress, Systemic Inflammation, and Severe Periodontitis. *J Dent Res*. 2010;89(11):1241–6.
107. SEPA. Sociedad Española de Periodoncia y Osteointegración. Guía de diagnóstico de tratamiento periodontal. 2018;1-148.

108. Elkerbout TA, Slot DE, Rijnen ME, Weijden GA. Change in oral hygiene behaviour after non-surgical periodontal therapy - A retrospective analyses. *Int J Dent Hyg.* 2022;12593.
109. Da Costa LFNP, Amaral C da SF, Barbirato D da S, Leão ATT, Fogacci MF. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J Am Dent Assoc.* 2017;148(5):308–18.
110. Poppolo Deus F, Ouanounou A. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J.* 2022;72(3):269-277.
111. Stein JM, Yekta-Michael SS, Schittenhelm F, Reichert S, Kupietz D, Dommisch H, et al. Comparison of three full-mouth concepts for the non-surgical treatment of stage III and IV periodontitis: A randomized controlled trial. *J Clin Periodontol.* 2021;48(12):1516–27.
112. Fang H, Han M, Li QL, Cao CY, Xia R, Zhang ZH. Comparison of full-mouth disinfection and quadrant-wise scaling in the treatment of adult chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Res.* 2016;51(4):417–30.
113. Eberhard J, Jepsen S, Jervøe-Storm PM, Needleman I, Worthington H V. Full-mouth treatment modalities (within 24 hours) for chronic periodontitis in adults. 2015(4):CD004622.
114. Pabst A, Sagheb K, Blatt S, Sagheb K, Schröger S, Wentaschek S, et al. Biomechanical Characterization of a New Acellular Dermal Matrix for Oral Soft Tissue Regeneration. *J Invest Surg.* 2022;35(6):1296-1303.
115. Fan L, Wu D. Enamel Matrix Derivatives for Periodontal Regeneration: Recent Developments and Future Perspectives. *J Healthc Eng.* 2022:8661690.
116. Pickert FN, Spalthoff S, Gellrich NC, Tarraga JAB. Cone-beam computed tomographic evaluation of dimensional hard tissue changes following alveolar ridge preservation techniques of different bone substitutes: a systematic review and meta-analysis. *J Periodontal Implant Sci.* 2022;52(1):3–27.
117. Martínez-Lage Azorín JF, Segura Andrés G, Faus López J, Agustín Panadero, R. Tratamiento de defectos intraóseos causados por enfermedad periodontal agresiva mediante derivados de la matriz del esmalte: revisión y descripción de la técnica Correspondencia a. *Rev la Sociedad Española Periodoncia y Osteointegración (SEPA).* 2013;23(1)49-58.
118. Zang SQ, Kang S, Hu X, Wang M, Wang XW, Zhou T, et al. Comparison of Different Periodontal Healing of Critical Size Noncontained and Contained Intrabony Defects in Beagles. *Chin Med J.* 2017;130(4):477–86.
119. Aichelmann-Reidy ME, Reynolds MA. Predictability of clinical outcomes following regenerative therapy in intrabony defects. *J Periodontol.* 2008;79(3):387–93.
120. Sculean A, Nikolidakis D, Schwarz F. Regeneration of periodontal tissues: combinations of barrier membranes and grafting materials - biological foundation and preclinical evidence: a systematic review. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):106–16.
121. Górski B, Szerszeń M. Effect of Root Surface Biomodification on Multiple Recession Coverage with Modified Coronally Advanced Tunnel Technique and Subepithelial Connective Tissue Graft: A Retrospective Analysis. *Gels.* 2022;8(1)31.

122. Mombelli A, Décaillet F, Almaghlouth A, Wick P, Cionca N. Efficient, minimally invasive periodontal therapy. An evidence based treatment concept. *Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin = Rev Mens suisse d'odonto-stomatologie*. 2011;121(2):145–57.
123. Hanes PJ, Purvis JP. Local anti-infective therapy: pharmacological agents. A systematic review. *Ann Periodontol*. 2003;8(1):79–98.
124. Paolantonio M, D'Angelo M, Grassi RF, Perinetti G, Piccolomini R, Pizzo G, et al. Clinical and microbiologic effects of subgingival controlled-release delivery of chlorhexidine chip in the treatment of periodontitis: a multicenter study. *J Periodontol*. 2008;79(2):271–82.
125. Kaner D, Bernimoulin JP, Hopfenmüller W, Kleber BM, Friedmann A. Controlled-delivery chlorhexidine chip versus amoxicillin/metronidazole as adjunctive antimicrobial therapy for generalized aggressive periodontitis: a randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2007;34(10):880–91.
126. Navarro-Pardo M, Márquez-Arrico CF, Pallarés-Serrano A, Silvestre FJ. Adherence to supportive periodontal treatment in relation to patient awareness. *J Clin Exp Dent*. 2022 ;14(1):e1-e8.
127. Lee CT, Huang HY, Sun TC, Karimbux N. Impact of Patient Compliance on Tooth Loss during Supportive Periodontal Therapy: A Systematic Review and Meta-analysis. *J Dent Res*. 2015;94(6):777–86.
128. Dimenäs SL, Jönsson B, Andersson JS, Lundgren J, Petzold M, Abrahamsson I, et al. A person-centred, theory-based, behavioural intervention programme for improved oral hygiene in adolescents: A randomized clinical field study. *J Clin Periodontol*. 2022;49(4):378–87.
129. Chaffee BW, Weston SJ. Association Between Chronic Periodontal Disease and Obesity: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Periodontol*. 2010;81(12):1708–24.
130. Suvan J, D'Aiuto F, Moles DR, Petrie A, Donos N. Association between overweight/obesity and periodontitis in adults. A systematic review. *Obes Rev*. 2011;12(5):e381-404.
131. Keller A, Rohde JF, Raymond K, Heitmann BL. Association between periodontal disease and overweight and obesity: a systematic review. *J Periodontol*. 2015;86(6):766–76.
132. Pischon N, Heng N, Bernimoulin J-P, Kleber B-M, Willich SN, Pischon T. Obesity, Inflammation, and Periodontal Disease. *J Dent Res*. 2007;86(5):400–9.
133. Reynolds MA. Modifiable risk factors in periodontitis: at the intersection of aging and disease. *Periodontol 2000*. 2014;64(1):7–19.
134. Huang X, Yu T, Ma C, Wang Y, Xie B, Xuan D, et al. Macrophages Play a Key Role in the Obesity-Induced Periodontal Innate Immune Dysfunction via Nucleotide-Binding Oligomerization Domain-Like Receptor Protein 3 Pathway. *J Periodontol*. 2016 ;87(10):1195–205.
135. Ylöstalo P, Suominen-Taipale L, Reunanen A, Knuutila M. Association between body weight and periodontal infection. *J Clin Periodontol*. 2008;35(4):297–304.

136. Chapple ILC, Matthews JB. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol* 2000. 2007;43(1):160–232.
137. Genco RJ, Grossi SG, Ho A, Nishimura F, Murayama Y. and Periodontal Infections. *J Periodontol*. 2005;76(11):2075–84.
138. Benguigui C, Bongard V, Ruidavets J-B, Chamontin B, Sixou M, Ferrières J, et al. Metabolic syndrome, insulin resistance, and periodontitis: a cross-sectional study in a middle-aged French population. *J Clin Periodontol*. 2010;37(7):601–8.
139. Timonen P, Suominen-Taipale L, Jula A, Niskanen M, Knuutila M, Ylöstalo P. Insulin sensitivity and periodontal infection in a non-diabetic, non-smoking adult population. *J Clin Periodontol*. 2011;38(1):17–24.
140. Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs DR, et al. Periodontal infection, systemic inflammation, and insulin resistance: Results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care*. 2012;35(11):2235–42.
141. Song IS, Han K, Park YM, Ji S, Jun SH, Ryu JJ, et al. Severe periodontitis is associated with insulin resistance in non-abdominal obese adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4251–9.
142. D’Aiuto F, Sabbah W, Netuveli G, Donos N, Hingorani AD, Deanfield J, et al. Association of the metabolic syndrome with severe periodontitis in a large U.S. population-based survey. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(10):3989–94.
143. Zhu M, Belkina AC, DeFuria J, Carr JD, Van Dyke TE, Gyurko R, et al. B cells promote obesity-associated periodontitis and oral pathogen-associated inflammation. *J Leukoc Biol*. 2014;96(2):349–57.
144. Dalla Vecchia CF, Susin C, Rösing CK, Oppermann RV, Albandar JM. Overweight and obesity as risk indicators for periodontitis in adults. *J Periodontol*. 2005;76(10):1721–8.
145. Tonetti MS. Periodontitis and risk for atherosclerosis: an update on intervention trials. *J Clin Periodontol*. 2009;36:15–9.
146. Southerland JH, Moss K, Taylor GW, Beck JD, Pankow J, Gangula PR, et al. Periodontitis and diabetes associations with measures of atherosclerosis and CHD. *Atherosclerosis*. 2012;222(1):196–201.
147. Gurav AN. The implication of periodontitis in vascular endothelial dysfunction. *Eur J Clin Invest*. 2014;44(10):1000–9.
148. Orlandi M, Suvan J, Petrie A, Donos N, Masi S, Hingorani A, et al. Association between periodontal disease and its treatment, flow-mediated dilatation and carotid intima-media thickness: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis*. 2014;236(1):39–46.
149. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen V V, Rasi VP, Kesäniemi YA, Syrjälä SL, et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *BMJ*. 1989;298(6676):779–81.
150. Haynes WG, Stanford C. Periodontal Disease and Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(8):1309–11.

151. Amar S, Gokce N, Morgan S, Loukideli M, Van Dyke TE, Vita JA. Periodontal disease is associated with brachial artery endothelial dysfunction and systemic inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23(7):1245–9.
152. 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;356(9):911–20.
153. Carvajal Carvajal Carlos. El endotelio: estructura, función y disfunción endotelial. *Med leg Costa Rica.* 2017;34(2):90–100.
154. Yakob M, Meurman JH, Jogestrand T, Nowak J, Söder PÖ, Söder B. C-reactive protein in relation to early atherosclerosis and periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2012;16(1):259–65.
155. Montilla M, Santi MJ, Carrozas MA, Ruiz FA. Biomarkers of the prothrombotic state in abdominal obesity. *Nutr Hosp.* 2015;31(3):1059-66.
156. Papapanou PN. Systemic effects of periodontitis: lessons learned from research on atherosclerotic vascular disease and adverse pregnancy outcomes. *Int Dent J.* 2015;65(6):283–91.
157. Canseco-Ávila Luis M, Jerjes-Sánchez Carlos, Ortiz-López Rocío, Rojas-Martínez Augusto, Guzmán-Ramírez Denisse. Fibrinógeno. ¿Factor o indicador de riesgo cardiovascular? *Arch Cardiol México.* 2006;76:158–72.
158. Sørensen B, Larsen OH, Rea CJ, Tang M, Foley JH, Fenger-Eriksen C. Fibrinogen as a hemostatic agent. *Semin Thromb Hemost.* 2012;38(3):268–73.
159. Kamath S, Lip GYH. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *QJM.* 2003;96(10):711–29.
160. Bošanská L, Michalský D, Lacinová Z, Dostálová I, Bártlová M, Haluzíková D, et al. The Influence of Obesity and Different Fat Depots on Adipose Tissue Gene Expression and Protein Levels of Cell Adhesion Molecules. 2010;59(1):79-88.
161. Miller MA, Cappuccio FP. Cellular adhesion molecules and their relationship with measures of obesity and metabolic syndrome in a multiethnic population. *Int J Obes.* 2006;30(8):1176–82.
162. Marcaccini AM, Meschiari CA, Sorgi CA, Saraiva MCP, de Souza AM, Faccioli LH, et al. Circulating interleukin-6 and high-sensitivity C-reactive protein decrease after periodontal therapy in otherwise healthy subjects. *J Periodontol.* 2009;80(4):594–602.
163. Rocha VZ, Libby P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat Rev Cardiol.* 2009;6(6):399–409.
164. Armingohar Z, Jørgensen JJ, Kristoffersen AK, Abesha-Belay E, Olsen I. Bacteria and bacterial DNA in atherosclerotic plaque and aneurysmal wall biopsies from patients with and without periodontitis. *J Oral Microbiol.* 2014;6(1)23408.
165. Kakoly N, Moran L, Teede H, Joham A. Cardiometabolic risks in PCOS: a review of the current state of knowledge. *Expert Rev Endocrinol Metab.* 2019;14(1):23–33.
166. van der Ham K, Louwers Y V., Laven JSE. Cardiometabolic biomarkers in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2022;117(5):887–96.

167. Rocha AL, Oliveira FR, Azevedo RC, Silva VA, Peres TM, Candido AL, et al. Recent advances in the understanding and management of polycystic ovary syndrome. 2019;26(8):F1000.
168. Wolf WM, Wattick RA, Kinkade ON, Olfert MD. Geographical prevalence of polycystic ovary syndrome as determined by region and race/ethnicity. *Int J Environ Res Public Health*. 2018;15(11):2589.
169. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum Reprod*. 2004;19(1):41–7.
170. Ochoa Marieta C, Roig Navarro J, Gómez B, Checa Vizcaino M, Reus R, Salvador Z. Síndrome del ovario poliquistico (SOP): causas, síntomas y tratamiento [Internet]. Reproducción Asistida, ORG. Web Médica acreditada por el Colegio de Médicos de Barcelona. [actualizado 1 de junio 2021]. Disponible en: <https://www.reproduccionasistida.org/sindrome-de-ovarios-poliquisticos/>.
171. Azziz R, Carmina E, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale F, Futterweit W, et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: the complete task force report Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society. *Fertil Steril*. 2009;91:456–88.
172. Goodman N, Cobin R, Futterweit W, Glueck J, Legro R, Carmina E. American Association of Clinical Endocrinologists, American College of Endocrinology, and Androgen Excess and PCOS Society Disease State clinical review: Guide to the best practices in the evaluation and treatment of polycystic ovary syndrome-Parte 1. *Endocr Pract*. 2015;21(11):1291–300.
173. Adamson GD, de Mouzon J, Chambers GM, Zegers-Hochschild F, Mansour R, Ishihara O, et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology: world report on assisted reproductive technology, 2011. *Fertil Steril*. 2018;110(6):1067–80.
174. NIH. National Institute of Health, Office of Disease Prevention Website. [Internet]. 2018 [actualizado 10 de mayo 2022]. Disponible en: https://prevention.nih.gov/search?search_api_fulltext=PCOS
175. Rosenfield RL. The Polycystic Ovary Morphology-Polycystic Ovary Syndrome Spectrum. *J Pediatr Adolesc Gynecol*. 2015;28(6):412.
176. Witchel SF, Oberfield S, Rosenfield RL, Codner E, Bonny A, Ibáñez L, et al. The Diagnosis of Polycystic Ovary Syndrome during Adolescence. *Horm Res Paediatr*. 2015;83(6):376–89.
177. Spritzer PM, Lecke SB, Satler F, Morsch DM. Adipose tissue dysfunction, adipokines, and low-grade chronic inflammation in polycystic ovary syndrome. *Reproduction*. 2015(5):R219–27.
178. Lizneva D, Suturina L, Walker W, Brakta S, Gavrilova-Jordan L, Azziz R. Criteria, prevalence, and phenotypes of polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2016;106(1):6–15.
179. Wang R, Mol BWJ. The Rotterdam criteria for polycystic ovary syndrome: evidence-based criteria? *Hum Reprod*. 2017;32(2):261–4.

180. Azziz R, Woods KS, Reyna R, Key TJ, Knochenhauer ES, Yildiz BO. The prevalence and features of the polycystic ovary syndrome in an unselected population. In: *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2004;89(6):2745-9.
181. Asunción M, Calvo RM, San Millán JL, Sancho J, Avila S, Escobar-Morreale HF. A Prospective Study of the Prevalence of the Polycystic Ovary Syndrome in Unselected Caucasian Women from Spain. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(7):2434-8.
182. Moran C, Tena G, Moran S, Ruiz P, Reyna R, Duque X. Prevalence of polycystic ovary syndrome and related disorders in mexican women. *Gynecol Obstet Invest*. 2010;69(4):274-80.
183. Davis SR, Knight S, White V, Claridge C, Davis BJ, Bell R. Preliminary indication of a high prevalence of polycystic ovary syndrome in indigenous Australian women. *Gynecol Endocrinol*. 2002;16(6):443-6.
184. Adams JM, Taylor AE, Crowley WF, Hall JE. Polycystic ovarian morphology with regular ovulatory cycles: Insights into the pathophysiology of polycystic ovarian syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*. 2004 Sep;89(9):4343-50.
185. Hernández E. Genética del Síndrome de Ovario Poliquístico. *Rev Obstet Ginecol Venez*. 2016;76(1):S10-S16.
186. Checa Vizcaíno M, Espinós Gómez J, Matorras Weining R. Síndrome del ovario poliquístico. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires (Argentina); Madrid (España): 2005; p1-182.
187. McCartney CR, Marshall JC. Polycystic Ovary Syndrome THE CLINICAL PROBLEM. *N Engl J Med*. 2017;375(1):54-64.
188. Mira R. Síndrome de ovario poliquístico-Teorías de su fisiopatología. *Bioquímica y Patol Clínica*. 2005;69:12-33.
189. Ruddenklau A, Campbell RE. Neuroendocrine Impairments of Polycystic Ovary Syndrome. *Endocrinology*. 2019;160(10):2230-42.
190. Vanhauwaert PS. Síndrome de ovario poliquístico e infertilidad. *Rev Médica Clínica Las Condes*. 2021;32(2):166-72.
191. Colegio Príncipe San Carlos, Bogotá C. Banco de imágenes de anatomía y reproducción femenina. [Internet]. Actualizado el 10 de agosto 2022. Disponible en: <https://cpsc.edu.co/>.
192. Eagleson CA, Gingrich MB, Pastor CL, Arora TK, Burt CM, Evans WS, et al. Polycystic ovarian syndrome: evidence that flutamide restores sensitivity of the gonadotropin-releasing hormone pulse generator to inhibition by estradiol and progesterone. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(11):4047-52.
193. Jakubowski L. Genetic aspects of polycystic ovary syndrome. *Endokrynol Pol*. 2005;56(3):285-93.
194. Ibáñez L, Oberfield S, Witchel S, Auchus R, Chang R, Codner E, et al. An International Consortium Update: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment of Polycystic Ovarian Syndrome in Adolescence. *Horm Res Paediatr*. 2017;88(6):371-97.

195. Cena H, Chiovato L, Nappi RE. Obesity, Polycystic Ovary Syndrome, and Infertility: A New Avenue for GLP-1 Receptor Agonists. *J Clin Endocrinol Metab.* 2020;105(8):e2695–709.
196. Balen AH, Morley LC, Misso M, Franks S, Legro RS, Wijeyaratne CN, et al. The management of anovulatory infertility in women with polycystic ovary syndrome: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance. *Hum Reprod Update.* 2016;22(6):687–708.
197. Yildiz BO, Knochenhauer ES, Azziz R. Impact of Obesity on the Risk for Polycystic Ovary Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(1):162.
198. De Leo V, Musacchio MC, Cappelli V, Massaro MG, Morgante G, Petraglia F. Genetic, hormonal and metabolic aspects of PCOS: An update. *Reprod Biol Endocrinol.* 2016;14(1):38.
199. Barber TM, McCarthy MI, Wass JAH, Franks S. Obesity and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol.* 2006 ;65(2):137–45.
200. Barber TM, Hanson P, Weickert MO, Franks S. Obesity and Polycystic Ovary Syndrome: Implications for Pathogenesis and Novel Management Strategies. *Clin Med Insights Reprod Heal.* 2019;13:117955811987404.
201. Veltman-verhulst SM, Boivin J, Eijkemans MJC, Fauser BJCM. Emotional distress is a common risk in women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis of 28 studies. *Hum Reprod Update.* 2012;18(6):638–51.
202. Orio F, Muscogiuri G, Nese C, Palomba S, Savastano S, Tafuri D, et al. Obesity, type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease risk: an uptodate in the management of polycystic ovary syndrome. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2016;207:214-219.
203. López-Domènech S, Bañuls C, Díaz-Morales N, Escribano-López I, Morillas C, Veses S, et al. Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur J Clin Invest.* 2018;48(8):e12985.
204. Dube R. Does endothelial dysfunction correlate with endocrinal abnormalities in patients with polycystic ovary syndrome? *Avicenna J Med.* 2016;6(4):91.
205. Conway G, Dewailly D, Diamanti-Kandarakis E, Escobar-Morreale HF, Franks S, Gambineri A, et al. The polycystic ovary syndrome: a position statement from the European Society of Endocrinology. *Eur J Endocrinol.* 2014;171(4):1-29.
206. Fauser BCJM, Tarlatzis BC, Rebar RW, Legro RS, Balen AH, Lobo R, et al. Consensus on women's health aspects of polycystic ovary syndrome (PCOS): The Amsterdam ESHRE/ASRM-Sponsored 3rd PCOS Consensus Workshop Group. In: *Fertility and Sterility.* 2012 Jan;97(1):28-38.e25.
207. Nölting M. LM. Pautas para el diagnóstico y tratamiento de los grandes síndromes endocrinos-ginecológicos. Estado hieperandrogénicos. 3ra ed. Editorial Ascune. Buenos Aires (Argentina); 2016; p119–142.
208. Zarezadeh M, Dehghani A, Faghfour AH, Radkhah N, Naemi Kermanshahi M, Hamed Kalajahi F, et al. Inositol supplementation and body mass index: A systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Obes Sci Pract.* 2021;8(3):387-397.

209. Shojaei-Zarghani S, Rafrat M. Resveratrol and Markers of Polycystic Ovary Syndrome: a Systematic Review of Animal and Clinical Studies. *Reprod Sci*. 2021;29(9):2477-2487.
210. Menichini D, Forte G, Orrù B, Gullo G, Unfer V, Facchinetti F. The role of vitamin D in metabolic and reproductive disturbances of polycystic ovary syndrome: A narrative mini-review. *Int J Vitam Nutr Res [Internet]*. 2022;92(2):126–33.
211. Santos IK dos, Ashe MC, Cobucci RN, Soares GM, Maranhão TM de O, Dantas PMS. The effect of exercise as an intervention for women with polycystic ovary syndrome: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*. 2020;99(16):e19644.
212. Manique MES, Ferreira AMAP. Polycystic Ovary Syndrome in Adolescence: Challenges in Diagnosis and Management. *Rev Bras Ginecol Obstet [Internet]*. 2022;44(4):425–33.
213. Woodward A, Broom D, Dalton C, Metwally M, Klonizakis M. Supervised Aerobic Exercise Training and Increased Lifestyle Physical Activity to Reduce Cardiovascular Disease Risk for Women With Polycystic Ovary Syndrome: A Randomized Controlled Feasibility Trial. *J Phys Act Health*. 2022;19(6):436–45.
214. Van Vliet HA, Raps M, Lopez LM, Helmerhorst FM. Quadriphasic versus monophasic oral contraceptives for contraception. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011;(11):1–29.
215. Attia GR, Rainey WE, Carr BR. Metformin directly inhibits androgen production in human thecal cells. *Fertil Steril*. 2001;76(3):517–24.
216. Sangeeta S. Metformin and Pioglitazone in Polycystic Ovarian Syndrome: A Comparative Study. *J Obstet Gynaecol*. 2012;62(5):551.
217. Amiri M, Tehrani FR, Nahidi F, Kabir A, Azizi F. Comparing the Effects of Combined Oral Contraceptives Containing Progestins With Low Androgenic and Antiandrogenic Activities on the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Patients With Polycystic Ovary Syndrome: Systematic Review and Meta-Analysis. *JMIR Res Protoc*. 2018;25;7(4):e113.
218. Lepine S, Jo J, Metwally M, Cheong YC. Ovarian surgery for symptom relief in women with polycystic ovary syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;11(11):CD009526.
219. Victor VM, Rocha M, Bañuls C, Alvarez A, de Pablo C, Sanchez-Serrano M, et al. Induction of Oxidative Stress and Human Leukocyte/Endothelial Cell Interactions in Polycystic Ovary Syndrome Patients with Insulin Resistance. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(10):3115–22.
220. Kocher T, König J, Borgnakke WS, Pink C, Meisel P. Periodontal complications of hyperglycemia/diabetes mellitus: Epidemiologic complexity and clinical challenge. *Periodontol 2000*. 2018;78(1):59–97.
221. Kessler JL. A Literature Review on Women's Oral Health Across the Life Span. *Nurs Womens Health*. 2017;21(2):108–21.
222. Robinson JL, Johnson PM, Kister K, Yin MT, Chen J, Wadhwa S. Estrogen signaling impacts temporomandibular joint and periodontal disease pathology. *Odontology*. 2020;108(2):153.

223. Chidi-Ogbolu N, Baar K. Effect of Estrogen on Musculoskeletal Performance and Injury Risk. *Front Physiol* [Internet]. 2018;9:1834.
224. Pazmino VFC, Assem NZ, Pellizzer EP, De Almeida JM, Theodoro LH. Influencia del estrógeno en la enfermedad periodontal: revisión de literatura. *Av en Periodoncia e Implantol Oral*. 2015;27(2):75–8.
225. Güncü GN, Tözüm TF, Çağlayan F. Effects of endogenous sex hormones on the periodontium--review of literature. *Aust Dent J*. 2005;50(3):138–45.
226. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang HL. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol*. 2003;30(8):671–81.
227. Brusca MI, Verdugo F, Amighini C, Albaina O, Moragues MD. Anabolic steroids affect human periodontal health and microbiota. *Clin Oral Investig*. 2014;18(6):1579–86.
228. Kumar PS. Sex and the subgingival microbiome: do female sex steroids affect periodontal bacteria? *Periodontol 2000*. 2013;61(1):103–24.
229. Mariotti A, Mawhinney M. Endocrinology of sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Periodontol 2000*. 2013;61(1):69–88.
230. Özçaka Ö, Ceyhan BÖ, Akcali A, Biçakci N, Lappin DF, Buduneli N. Is There an Interaction Between Polycystic Ovary Syndrome and Gingival Inflammation? *J Periodontol*. 2012;83(12):1529–37.
231. Akcali A, Bostanci N, Özçaka Ö, Öztürk-Ceyhan B, Gümüş P, Buduneli N, et al. Association between polycystic ovary syndrome, oral microbiota and systemic antibody responses. *PLoS One*. 2014;9(9):e108074.
232. Wendland N, Opydo-Szymaczek J, Mizgier M, Jarzabek-Bielecka G. Subgingival microflora in adolescent females with polycystic ovary syndrome and its association with oral hygiene, gingivitis, and selected metabolic and hormonal parameters. *Clin Oral Investig* [Internet]. 2021;25(3):1485–96.
233. Vittek J, Hernandez MR, Wenk EJ, Rappaport SC, Southren AL. Specific Estrogen Receptors in Human Gingiva. *J Clin Endocrinol Metab*. 1982;54(3):608–12.
234. Smadi L. Gingival and periodontal changes in patients undergoing in vitro fertilization treatment: A clinical study. *Indian J Dent Res*. 2017;28(6):650–4.
235. Fajardo Puig Martha Elena, Rodríguez Reyes Oscar, Rodríguez Bacallao Acela. Las hormonas sexuales femeninas y su relación con la enfermedad periodontal. *MEDISAN*. 2017;108–12.
236. González Quesada J, Jorquera Cortés R, Jorquera Cortés O, Rivera Álvarez S. Niveles de interleukina 17 en el fluido gingival crevicular de pacientes con periodontitis crónica progresiva Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid (CGF) of progressive chronic periodontitis patients. *Av Periodon Implant*. 2009;21:157–62.
237. Deepti, Tewari DS, Chander Narula DS, Rani Singhal DS, Kumar Sharma DR. Effect of Non-surgical Periodontal Therapy Along With Myo-Inositol on High Sensitivity C-Reactive Protein and Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome Women Having Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Trial. *J Periodontol*. 2017;88(10):999-1011.

238. Wisse BE. The inflammatory syndrome: the role of adipose tissue cytokines in metabolic disorders linked to obesity. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(11):2792–800.
239. Liccardo D, Cannavo A, Spagnuolo G, Ferrara N, Cittadini A, Rengo C, et al. Periodontal Disease: A Risk Factor for Diabetes and Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci.* 2019;20(6):1414.
240. Wu CP, Tu YK, Lu SL, Chang JH, Lu HK. Quantitative analysis of Miller mobility index for the diagnosis of moderate to severe periodontitis - A cross-sectional study. *J Dent Sci.* 2018;13(1):43–7.
241. Añez R, Morillo J, Rojas M, Torres J, Apruzzese V, Martínez MS, et al. Homeostasis Model Assessment (HOMA-IR) cut-off point for insulin resistance in adults from Maracaibo municipality-Zulia State, Venezuela. *Avances en Biomedicina.* 2015;4(1):9–18.
242. Lee CL, Liu WJ, Tsai SF. Development and Validation of an Insulin Resistance Model for a Population with Chronic Kidney Disease Using a Machine Learning Approach. *Nutrients.* 2022;14(14):2832.
243. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia.* 1985;28(7):412–9.
244. Bañuls C, Rovira-Llopis S, Martínez de Marañón A, Veses S, Jover A, Gomez M, et al. Metabolic syndrome enhances endoplasmic reticulum, oxidative stress and leukocyte–endothelium interactions in PCOS. *Metabolism.* 2017;71:153–62.
245. Tong C, Wang YH, Yu HC, Chang YC. Increased Risk of Polycystic Ovary Syndrome in Taiwanese Women with Chronic Periodontitis: A Nationwide Population-Based Retrospective Cohort Study. *J Womens Health.* 2019;28(10):1436–41.
246. Machado V, Escalda C, Proença L, Mendes JJ, Botelho J. Is There a Bidirectional Association between Polycystic Ovarian Syndrome and Periodontitis? A Systematic Review and Meta-analysis. *J Clin Med.* 2020;9(6):1–16.
247. Saljoughi F, Nasri K, Bayani M. Gingival crevicular fluid levels of visfatin in patients with chronic periodontitis and polycystic ovary syndrome. *Obstet Gynecol Sci.* 2020;63(1):87.
248. Saglam E, Canakcı CF, Sebin SO, Saruhan N, Ingec M, Canakcı H, et al. Evaluation of Oxidative Status in Patients With Chronic Periodontitis and Polycystic Ovary Syndrome: A Cross-Sectional Study. *J Periodontol.* 2018;89(1):76–84.
249. Hameed DJ, Ahmed MA-A. Evaluation of Serum Homocysteine and Nitric Oxide Levels in Women with Polycystic Ovarian Syndrome and Periodontal Diseases. *Tikrit J Dent Sci.* 2017;5:57–65.
250. Sanz M, Herrera D, Kerschull 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;47(S22):4–60.
251. G. Caton J, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman K, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):S1–8.

252. De la Guardia Gutiérrez MA, Ruvalcaba Ledezma JC. La salud y sus determinantes, promoción de la salud y educación sanitaria. *JONNPR*. 2020;5(1):81–90.
253. Rahiminejad ME, Moaddab A, Zaryoun H, Rabiee S, Moaddab A, Khodadoustan A. Comparison of prevalence of periodontal disease in women with polycystic ovary syndrome and healthy controls. *Dent Res J*. 2015;12(6):507–12.
254. Song I-S, Han K, Park Y-M, Ji S, Jun SH, Ryu J-J, et al. Severe Periodontitis Is Associated with Insulin Resistance in Non-abdominal Obese Adults. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(11):4251–9.
255. Işık Y, Telatar GY, Neşelioğlu S, Biçer C, Gürlek B. Evaluation of periodontal status in different phenotypes of polycystic ovary syndrome in untreated patients of early reproductive age: A case-control study. *J Obstet Gynaecol Res*. 2020;46(3):459–65.
256. Greenhill C. Reproductive endocrinology: PCOS raises risk of periodontitis. *Nat Rev Endocrinol*. 2010;6(12):656.
257. Vasudevan S, Renuka JV, Sylvia DS, Challa R, Padmakanth M, Reddy A. Evaluation of gingival inflammation in patients using ovulation induction drugs before and after scaling. *J Contemp Dent Pract*. 2013;14(6):1165–8.
258. Blanco-Pintos T, Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Tomás I. Update on the Role of Cytokines as Oral Biomarkers in the Diagnosis of Periodontitis. *Adv Exp Med Biol*. 2022;1373:283–302.
259. Demmer RT, Squillaro A, Papapanou PN, Rosenbaum M, Friedewald WT, Jacobs DR, et al. Periodontal Infection, Systemic Inflammation, and Insulin Resistance: Results from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999-2004. *Diabetes Care*. 2012;35(11):2235–42.
260. Timpson NJ, Nordestgaard BG, Harbord RM, Zacho J, Frayling TM, Tybjærg-Hansen A, et al. C-reactive protein levels and body mass index: elucidating direction of causation through reciprocal Mendelian randomization. *Int J Obes*. 2011;35(2):300–8.
261. Glintborg D, Andersen M, Richelsen B, Bruun JM. Plasma monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage inflammatory protein-1alpha are increased in patients with polycystic ovary syndrome (PCOS) and associated with adiposity, but unaffected by pioglitazone treatment. *Clin Endocrinol*. 2009;71(5):652–8.

ANEXOS

ANEXO I

Consentimiento informado, información al paciente y certificado del comité ético

ANEXOS

1.1. Consentimiento informado, compromiso de confidencialidad y hoja de información al paciente.

Investigador Principal: Cecilia Fabiana Márquez
Servicio de Odontología, Hospital Universitario Dr. Peset

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

La siguiente información describe el proyecto de investigación: **Estudio de la enfermedad periodontal en pacientes con y sin síndrome de ovario poliquístico**, y su papel como participante del mismo. Por favor, lea atentamente esta hoja y no dude en preguntar al doctor cualquier duda que pueda tener acerca de la información que le presentamos a continuación.

¿Cómo surge este proyecto?

Este estudio surge con la idea de ver si existe relación entre el estado inflamatorio sistémico y la enfermedad de las encías (enfermedad periodontal) comparando entre pacientes con y sin ovario poliquístico, para determinar, en caso de que exista relación, estrategias saludables con el fin de mejorar la calidad de vida de las pacientes que tienen el síndrome ovario poliquístico. Este estudio ha sido aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con medicamentos (CEIm) del Hospital Universitari Dr. Peset.

¿Cuál es su objetivo?

El objetivo del estudio es comparar el estado periodontal de pacientes con síndrome de ovario poliquístico frente a pacientes sin dicho síndrome,) para ver si los pacientes afectados presentan peor estado de las encías. Igualmente, se pretende observar si surgen cambios tanto a nivel general como a nivel bucal tras someter a las pacientes que tienen enfermedad de las encías en un tratamiento de higiene bucal. Mediante esta actuación se pretende evitar complicaciones asociadas a la enfermedad, así como una pérdida precoz de los dientes. Se pretende incluir 77 sujetos para llevar a cabo el proyecto de investigación.

¿En qué consiste?

El participante se someterá a una serie de exploraciones clínicas habituales:

- Se le realizarán una serie de preguntas sobre antecedentes médicos y dentales.
- Se le tomarán mediciones antropométricas (peso, altura, perímetro abdominal)
- Se le tomará la tensión arterial.
- Se le realizará un cuestionario sobre hábitos.
- Se le realizará un estudio periodontal.
- Se le realizará un análisis de sangre.

También, se le realizará un **tratamiento periodontal (higiene bucal)**.

Posibles beneficios

Se le realizará una analítica completa de sangre y de su perfil hormonal, obtendrá los resultados y se le informará de ello, aconsejándole la asistencia a un especialista en caso de que lo necesite. Conocerá el estado de su salud bucodental, recibirá consejos e instrucciones para el cuidado de su salud dental, y se le realizará gratuitamente una limpieza dental y tratamiento periodontal si lo necesita.

Molestias derivadas de su participación

En caso de realizarse tratamiento periodontal, será necesaria la aplicación de anestesia local que puede ocasionar molestias leves. Los primeros días después de la limpieza dental y del tratamiento periodontal, podrá notar sensibilidad dental, que disminuye al pasar los días.

Participación voluntaria

Su participación en este estudio es voluntaria. Usted puede rechazar participar en el mismo o retirarse de él en cualquier momento sin estar obligado a justificar ni explicar su decisión. Ni rechazar ni aceptar su participación en este estudio influirá de manera alguna en la atención médica que recibe habitualmente. Debe conocer que su papel en el estudio es ser partícipe de una revisión de las encías, además del de hacerse una analítica para poder valorar los factores

Investigador Principal: Cecilia Fabiana Márquez
Servicio de Odontología, Hospital Universitario Dr. Peset

inflamatorios que nos conciernen. Y, en el caso que presente enfermedad periodontal, será tratado para mejorar su salud bucodental.

Confidencialidad

Sus datos personales y de contacto, permanecerán anónimos y serán confidenciales, por lo que todo el material escrito, impreso y electrónico será codificado y sólo conocido por el grupo investigador se cumplirá con la Ley Orgánica de Protección de Datos Personales y Garantías de los Derechos Digitales (LPDPGDD) 3/2018 del 5 de diciembre y el correspondiente Real Decreto 1720/07, además se aplicará el Reglamento (UE) 2016/679 del Parlamento europeo y del Consejo de 27 de abril de 2016 de Protección de Datos (RGPD), por lo que, de acuerdo con Anexo VIII C de las Instrucciones para la actualización del apartado Protección de datos personales en la hoja de información al sujeto (HIP/CI) en lo relativo a este Reglamento Europeo usted puede ejercer el derecho ARCO (Acceso, Rectificación, Cancelación y Oposición) sobre sus datos, que le garantizan: derechos de acceso (pedir información sobre la información suya que hay guardada en la base de datos), rectificación (si con el tiempo se modifica algún dato o se detecta algún error), de cancelación (solicitar que se destruyan los datos) y de oposición (negarse a dar los datos). La información clínica, epidemiológica, y la derivada de sus muestras biológicas, pasará a formar parte de una base de datos de forma codificada, a la que tendrá acceso la investigadora principal, el grupo de investigación del Servicio de Odontología y la Unidad Central de Investigación Biomédica del Hospital Universitario Dr. Peset durante el tiempo necesario para el desarrollo de la investigación.

Dichos datos serán tratados y cedidos con la única y exclusiva finalidad de llevar a cabo la investigación biomédica descrita en este documento y siempre de forma codificada.

¿A quién contactar en caso de necesitar más información?

El equipo investigador responsable de llevar adelante este proyecto podrá responderle todas sus preguntas sobre su papel como participante en el estudio y sobre otros aspectos relacionados con el mismo. Si surge cualquier duda o información adicional que pueda requerir puede ponerse en contacto con la Dra. Cecilia Fabiana Márquez (investigador principal) al teléfono de la Unidad de Estomatología: 96- 162 23 92, en el horario de mañanas.

¡Muchas gracias por su tiempo y colaboración!

Investigador Principal: Cecilia Fabiana Márquez
Servicio de Odontología, Hospital Universitario Dr. Peset

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio:

“Estudio de la enfermedad periodontal en pacientes con y sin síndrome de ovario poliquístico“

D./Dña, con D.N.I:..... (nombre y apellidos del paciente), declara que:

- ✓ He recibido la hoja de información que se me ha entregado.
- ✓ He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- ✓ He recibido respuestas satisfactorias a mis preguntas
- ✓ He recibido suficiente información sobre el estudio
- ✓ Comprendo que la participación es voluntaria
- ✓ Comprendo que puedo retirarme del estudio: cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

De igual modo, declaro haber sido informado de las medidas que serán adoptadas para garantizar la confidencialidad y disociación de cuanta información sobre mi persona pudiera recogerse durante el desarrollo del estudio, así como de la posibilidad de ejercitar mis derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición a través de una petición formal realizada ante el responsable del estudio.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

(Firma del participante)

Fecha __/__/__

(Firma del investigador)

Fecha __/__/__


Revocación de consentimiento informado


Firma del participante: _____ Fecha __/__/__

• Recibirá una copia de esta hoja de información al paciente y documento de consentimiento informado.

A efectos de la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y garantía de los derechos digitales, autorizo a que mis datos personales sean incluidos en un fichero automatizado con la finalidad del normal seguimiento del estudio.

1.2. Certificado de la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario Dr. Peset para la realización de esta Tesis Doctoral.

 **GENERALITAT VALENCIANA**
CONSELLERIA DE SANITAT UNIVERSAL I SALUT PUBLICA

 **DEPARTAMENT DE SALUT DE VALÈNCIA**
DOCTOR PESET


A/A.: Cecilia Fabiana Márquez
Odontología


Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación con Medicamentos del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 17 de abril de 2019 ha evaluado y ha aprobado el estudio titulado: Estudio de la enfermedad periodontal y de la respuesta al tratamiento periodontal no-quirúrgico en pacientes con síndrome de ovario poliquístico.
Proyecto de investigación. Tesis doctoral
Código CEIm: 31/19

Valencia 24 de abril de 2019




HOSPITAL "Dr. Peset"
COMITÉ ÈTIC DE INVESTIGACIÓ CLÍNICA
VALÈNCIA - CONSELLERIA DE SANITAT UNIVERSAL I SALUT PÚBLICA

Fdo.: Dra. Pilar Codoñer Franch

CERTIFICADO DE COMPROMISO CON LOS POSTULADOS ÉTICOS DE ESTUDIOS CLÍNICOS

Prof. Dr. D. Francisco Javier Silvestre Donat, profesor titular del Departamento de Estomatología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universitat de València, y Jefe de Servicio de Estomatología del Hospital Universitario Dr. Peset,

CERTIFICA

Que como director del trabajo de investigación titulado: ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO EN PACIENTES CON SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO se compromete a dirigirlo y realizarlo en las condiciones de respeto a los derechos fundamentales de la persona y los postulados éticos que afectan a la investigación biomédica con seres humanos, siguiendo los contenidos de la Declaración de Helsinki.

Y para que conste y surta efecto se expide la presente certificación en Valencia a 28 de Enero de 2019

Fdo: Prof. F. J. Silvestre

Jefe de Servicio de Estomatología
Hospital Universitario Dr. Peset

**CARTA DE PRESENTACIÓN/ COMPROMISO FIRMADA POR EL
INVESTIGADOR PRINCIPAL**

COMPROMISO DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

Declaro:

I.P: CECILIA FABIANA MÁRQUEZ de acuerdo con la actividad solicitada para el estudio titulado ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y DE LA Hospital Universitario Dr. Peset (Valencia)

Hace constar:

Que conoce y acepta participar como investigador principal en el estudio titulado:

**ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD PERIODONTAL Y DE LA RESPUESTA AL
TRATAMIENTO PERIODONTAL NO-QUIRÚRGICO EN PACIENTES CON
SÍNDROME DE OVARIO POLIQUÍSTICO**

Que se compromete a que los datos de cada sujeto sean tratados y controlados siguiendo lo establecido en el protocolo autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica.

Que respetará las normas éticas y legales aplicables a este tipo de estudio y seguirá las Normas de Buena Práctica Clínica en su realización.

En Valencia a 28 de Enero de 2019.

Firmado: Dra. Cecilia Fabiana Márquez



ANEXO II

Fichas para recogida de datos

2.1. Recogida de las variables periodontales por medio del periodontograma.

PERIODONTOGRAMA Fecha 1º ___/___/___ Fecha Rev ___/___/___

PS 2º																			
PS 1º																			
MAXILAR	vest.																		
	palat.																		
PS 1º																			
PS 2º																			

PS 2º																			
PS 1º																			
MANDIBULAR	palat.																		
	vest.																		
PS 1º																			
PS 2º																			

Diagnóstico de EP

Gingivitis:

Periodontitis:

Estadio ___ Grado ___

Índice de Sangrado 1º: ___

2º Índice de Placa

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7

7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7

PS: 1º ___ PS: 2º ___

PIC: 1º ___ PIC: 2º ___

Plan de Tratamiento:

Reevaluación y plan de mantenimiento o terapia quirúrgica:

Criterios de Periodontitis CDC/AAP

Nula/leve	Ni grave ni moderada
Moderada	= 2 sitios interproximales PIC =4mm (no en el mismo diente) o = 2 sitios interproximales con PS = 5 mm (no en el mismo diente) = 2 dientes vest/palat PIC =3 mm con PS >3 mm
Severa	= 2 sitios interproximales con PIC =6 mm (no en el mismo diente); o = 1 sitios interproximales con PS = 5 mm.

	1.6	2.1	2.4	3.6	4.1	4.4
1º						
2º						

Índice de Cálculo

	1.6	2.1	2.4	3.6	4.1	4.4
1º						
2º						

EXPLORACIONES CLÍNICAS

Parámetros antropométricos

	Talla-S (m)	Cintura-W (cm)	Cadera-H (cm)	BMI (Kg/m ²)	WHR (W/H)	WSR (W/S)
1º cita						
2º cita						

Tensión arterial

	SBP (mmHg)	DBP (mmHg)	Media
1º cita			
2º cita			

HTA= SBP = 130mmHg / DBP = 85mmHg

Resistencia a la Insulina

HOMA-IR= (Insulina x glucosa/405)
1º= _____
2º= _____

HÁBITOS

Hábito tabáquico

<i>¿Fuma?</i>	<i>Tipo:</i>	<i>¿Desde cuándo fuma?</i>	<i>Nº de cigarrillos por día</i> _____
1. SI	1. Cigarrillos	1. <1 año	1. 0 cigarrillos/día
2. NO	2. Cigarrillo electrónico	2. 1-5 años	2. 1-10 cigarrillos/día
3. Ex fumador		3. > 5años	3. 10-20 cigarrillos/día
Nº años sin fumar _____			4. 20-40 cigarrillos/día
			5. >40 cigarrillos/día

Consumo de alcohol y otras sustancias

¿Consumo usted bebidas alcohólicas? 1. Sí 2. No

Consumo de otras sustancias: _____

Y cantidad y frecuencia: _____

En los últimos 30 días, en los días que bebió alcohol ¿cuántas bebidas tomó al día?

1. < 1 bebida
2. 2 bebidas
3. 3 bebidas
4. 4 bebidas
5. 5 o más bebidas

2.3. Ficha de datos bioquímicos, hormonas sexuales, citoquinas proinflamatorias y parámetros de disfunción endotelial.

Parámetros bioquímicos	Basal	3 meses	Valores Estándar
Glucosa (mg/dL)			70-100
Insulina (μ UI/mL)			2-14
A1c (%)			4-6
Colesterol total (mg/dL)			80-200
cHDL (mg/dL)			35-50
c LDL (mg/dL)			40-150
Triglicéridos (mg/dL)			30-150
PCRus (mg/L)			0-1,69
Fibrinógeno (mg/dL)			200-500
C3 (mg/dL)			90-180
Homocisteína (μ mol/L)			5-15
RBP4 (mg/dL)			3-9
TNF α (pg/dL)			—
IL-6 (pg/mL)			—

Hormonas Sexuales	Basal	3 Meses	Valores Estándar
FSH (folículo estimulante)			3-9 mUI/mL
LH (luteizante)			2-10 mUI/mL
Estradiol			27-161 pg/mL
Testosterona			24-47 ng/dL
Androstendiona			1,6 ng/mL
DHEA-S (dehidroepiandrosterona sulfato)			Min 45- max 380 μ g/dL
17-OH progesterona			<200 ng/dL
SHBG (globulina fijadora de h. sexuales)			24.6-122 nmol/L
IAL (índice de andrógeno libre)			7-10
Prolactina			0-20 ng/dL

Determinación de citoquinas proinflamatorias

IL6 (pg/mL)		
TNF α (pg/mL)		
MPO (ng/mL)		
MCP1(%expresión)		
JNK (%expresión)		
NFkB (%expresión)		

Parámetros de disfunción endotelial

Adhesión (μ m/s)	
Flujo de rodamiento (cells/mir)	
Velocidad de rodamiento (cells/mm ²)	
sICAM (ng/mL)	
sVCAM (ng/mL)	

ANEXO III

Comunicaciones representativas en congresos nacionales e internacionales y publicaciones con autoría durante el desarrollo de la Tesis Doctoral

3. Otros méritos durante la formación del doctorado.

Comunicaciones representativas en congresos nacionales e internacionales durante el desarrollo de la Tesis Doctoral.

1. **Título:** Efecto antiinflamatorio del d-pinitol en pacientes con periodontitis y su implicación en las interacciones leucocito-endotelio: Estudio piloto con perspectiva de género.

Autores: Milagros Rocha; Meylin Fernandez Reyes; Cecilia Fabiana Márquez Arrico; Belén Bolinchez Díez; Celia García Gargallo; Zaida Abad Jiménez; Sandra López Domènech; Javier Silvestre Rangil; Francisco Javier Silvestre; Víctor Manuel Víctor González.

Congreso: XXXIV Congreso de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, Madrid, Comunidad de Madrid, España, celebrado el día 8 de junio del 2022.

2. **Título:** Alteraciones de la densidad ósea de los maxilares en pacientes con hiperparatiroidismo primario normocalcémico y su relación con la enfermedad periodontal.

Congreso: Fundación SEPA- Periodoncia, Implantes y Osteointegración, Sevilla, Andalucía, España, celebrado el 25 de noviembre del 2021.

Autores: Samuel García Rueda; Francisco Javier Silvestre; Mayte Martínez Herrera; Cecilia Fabiana Márquez-Arrico; Eva Solá Izquierdo.

3. **Título:** COVID19 and Periodontal Disease: A dangerous association?

Congreso: Congreso SEONE (Sociedad Española de Odontostomatología para el minusválido y pacientes especiales) Barcelona, Cataluña, España, celebrado el 19 de noviembre del 2021.

Autores: Cecilia Fabiana Márquez Arrico; Fernández Reyes Meylin; Milagros Rocha; Javier Silvestre Rangil; Francisco Javier Silvestre. "COVID19 and Periodontal Disease: A dangerous association?".

4. **Título:** Influencia de la Gingivitis sobre el perfil inflamatorio, en pacientes con el Síndrome de Ovarios Poliquístico (estudio clínico y bioquímico).

Congreso: Congreso SEOENE, Barcelona, Cataluña, España, celebrado el 19 de noviembre del 2021.

Autores: Francisco Javier Silvestre; Meylin Fernández Reyes; Cecilia Fabiana Márquez Arrico; Zaida Abad Jiménez; Milagros Rocha.

5. **Título:** Obesidad, enfermedad periodontal y riesgo cardiovascular subclínico: efecto del tratamiento periodontal no-quirúrgico.

Congreso: XXXI Congreso de la Sociedad Valenciana de Endocrinología, Diabetes y Nutrición (SVEDyN), Alicante, Comunidad Valenciana, España, celebrado el 29 de noviembre del 2019.

Autores: Sandra López Domènech; Laura Guitiérrez Castillo; Cecilia Fabiana Márquez Arrico; Francisco Javier Silvestre; Zaida Abad Jiménez.

6. **Título:** Asociación entre la enfermedad periodontal y el Síndrome de Ovario Poliquístico: Revisión Sistemática.

Congreso: Congreso Internacional de Pacientes Especiales (SEOENE 2019), Jaén, Andalucía, España, celebrado el 7 de noviembre del 2019.

Autores: Cecilia Fabiana Márquez Arrico; Milagros Rocha Barajas; Laura Gutiérrez Castillo; Reyes Balanzá; Francisco Javier Silvestre.



Review

Association between Periodontal Diseases and Polycystic Ovary Syndrome: A Systematic Review

Cecilia Fabiana Márquez-Arrico ¹, Javier Silvestre-Rangil ², Laura Gutiérrez-Castillo ¹,
Mayte Martínez-Herrera ², Francisco Javier Silvestre ^{1,2,*} and Milagros Rocha ^{3,4,*}

¹ Department of Stomatology, University Hospital Doctor Peset-FISABIO, 46017 Valencia, Spain; cecilia.fabiana.m@gmail.com (C.F.M.-A.); laugcs95@gmail.com (L.G.-C.)

² Department of Stomatology, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain; silranja@uv.es (J.S.-R.); maytemartinez05@gmail.com (M.M.-H.)

³ Department of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset-FISABIO, 46017 Valencia, Spain

⁴ CIBER CB06/04/0071 Research Group, CIBER Hepatic and Digestive Diseases, University of Valencia, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: francisco.silvestre@uv.es (F.J.S.); milagros.rocha@uv.es (M.R.)

Received: 2 April 2020; Accepted: 19 May 2020; Published: 23 May 2020



Abstract: Background: A convergent association between polycystic ovary syndrome (PCOS) and periodontal disease, in particular chronic periodontitis (CP), has recently been proposed. The underlying molecular mechanisms of this association are not fully understood, though it is thought that chronic inflammation is responsible. Therefore, the aim of this study was to evaluate the association between periodontal disease—gingivitis and CP—and PCOS. Materials and Methods: The PICO (Participants, Intervention, Control, and Outcomes) question was as follows: “Is there an association between PCOS and CP?” A systematic review of three databases—PubMed, Embase and Scopus—was performed following PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines. Original studies in human cohorts carried out in the last 10 years and including a control group were eligible for inclusion. Letters to the editor, case reports, and reviews were not considered. Results: Ten articles met all the selection criteria and provided a positive answer to the PICO question. Our review of these articles revealed an association between CP and PCOS, since periodontal parameters were altered more frequently in patients with these conditions than in healthy young women. This altered periodontal response in PCOS was associated with a proinflammatory status that seemed to increase susceptibility to periodontal disease. Conclusion: Patients with PCOS appear to be more susceptible to developing periodontal diseases than women without the pathology.

Keywords: periodontal diseases; chronic periodontitis; polycystic ovary syndrome; insulin resistance

1. Introduction

Periodontal diseases are infectious diseases caused by bacteria that affect the periodontium, which is composed of the gum, periodontal ligament, cement, and alveolar bone. There are two major types of periodontal diseases: gingivitis (gum inflammation) and periodontitis (irreversible destruction of periodontal tissues) [1]. Chronic periodontitis (CP) is initiated by an accumulation of bacterial plaque containing periodontopathic germs, which require the presence of a susceptible host [2]. The presence of supra- and subgingival biofilms triggers the activation of the host’s immune system, primarily with protective objectives, but this ultimately leads to the destruction of periodontal tissues due to the synthesis and release of cytokines, proinflammatory mediators, and matrix metalloproteinases

(MMPs) [3], which favour the chronification of low-grade inflammation [4,5]. The high prevalence of periodontal disease in adolescents, adults, and older individuals (it affects 25.4% of adults) makes it a serious public health concern. CP has a significant impact on oral health-related quality of life, especially when the disease worsens and has more detrimental consequences. CP results in a loss of connective tissue and bone support, and is a major cause of tooth loss in adults. It also causes dental mobility, malocclusions, and cysts, and it can cause blood infections such as bacteremia or septicemia [6]. In addition, due to its chronic inflammatory nature, CP is associated with a systemic state of oxidative stress, mitochondrial dysfunction [6], and multiple systemic diseases [7,8]. Diabetes mellitus is a traditional risk factor for CP and a bidirectional association between the two diseases has been established [9]. In recent years, newly discovered interactions between CP and other systemic disorders have been the subject of translational research that has confirmed an association of CP with other insulin-resistance (IR) diseases, such as polycystic ovary syndrome (PCOS), rheumatoid arthritis, and cardiovascular disease (CVD), and with a risk of premature births and even some types of cancer [10,11].

PCOS is a complex endocrine disorder characterized by the presence of anovulation, menstrual dysfunction, infertility, and hirsutism. In its typical form, it is frequently associated with obesity (predominantly of the abdominal phenotype), dyslipidemia, IR, and hyperinsulinemia, thereby increasing the risk of type 2 diabetes and CVD [12]. The pathogenesis of PCOS is poorly understood, but chronic infections like those that characterise this disease are associated with an increase in oxidative stress and systemic inflammation, and in lipid peroxidation markers, myeloperoxidase, c-reactive protein (CRP), inflammatory cytokines, adhesion molecules, and blood lymphocytes and monocytes [13–15]. These are in turn involved in the higher risk of type 2 diabetes and CVD among PCOS patients, and contribute to IR and hyperinsulinemia [16].

Recently, a significant association has been proposed between CP and PCOS. The stimulation and chronic secretion of proinflammatory cytokines associated with periodontal infection contributes to IR. This pathognomonic state of systemic inflammation and IR, present in both CP and PCOS, could be a etiologic mechanism linking these two diseases [17].

There are very few published studies on the association between PCOS and CP. Özçaka et al. determined that PCOS can influence gingival inflammation [18]. Porwal et al. observed that women with PCOS had higher rates of gingival inflammation and periodontal destruction than those without the syndrome, confirming a higher prevalence and probability of CP among the former [16]. Based on the available evidence, we aimed to evaluate the association between periodontal disease and PCOS, focusing particularly on CP and the molecular mechanisms (mainly inflammatory) that might be involved. To do this, we have carried out a systematic review.

2. Material and Methods

2.1. PICO Question

Based on the PRISMA [19] guide (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses), we used an evidence-based model for framing a PICO question model (PICO: Participants, Intervention, Control, and Outcomes).

The question posed was the following: Is there an association between PCOS and CP? (P) Participants: women of reproductive age who had undergone medical and dental evaluations. (I) Interventions: evaluation of periodontal status in patients diagnosed with PCOS. (C) Control: healthy women, of similar age and weight, who have undergone medical and dental evaluations. (O) Outcome measures: periodontal clinical parameters and inflammatory and microbiological mediators in patients with and without PCOS.

The following keywords were used in three databases, Pubmed (National Library of Medicine, Washington, DC, USA), EMBASE, and Scopus (Elsevier B.V): “Polycystic ovary syndrome” AND “Periodontitis”.

2.2. Selection of Articles

The criteria for the inclusion of articles were: original articles reporting prospective or retrospective case-control or cohort studies carried out in humans in the previous 10 years in which a control group had been included.

The following exclusion criteria were established: full text not available, letters to the editor, and case reports and bibliographic reviews. Once the articles had been identified, we screened them by reading the abstracts and excluding the articles whose content did not involve periodontal disease and its relationship with PCOS. Duplicated articles were also eliminated. In this way, we were left only with the articles that met the criteria to answer the PICO question (Figure 1).

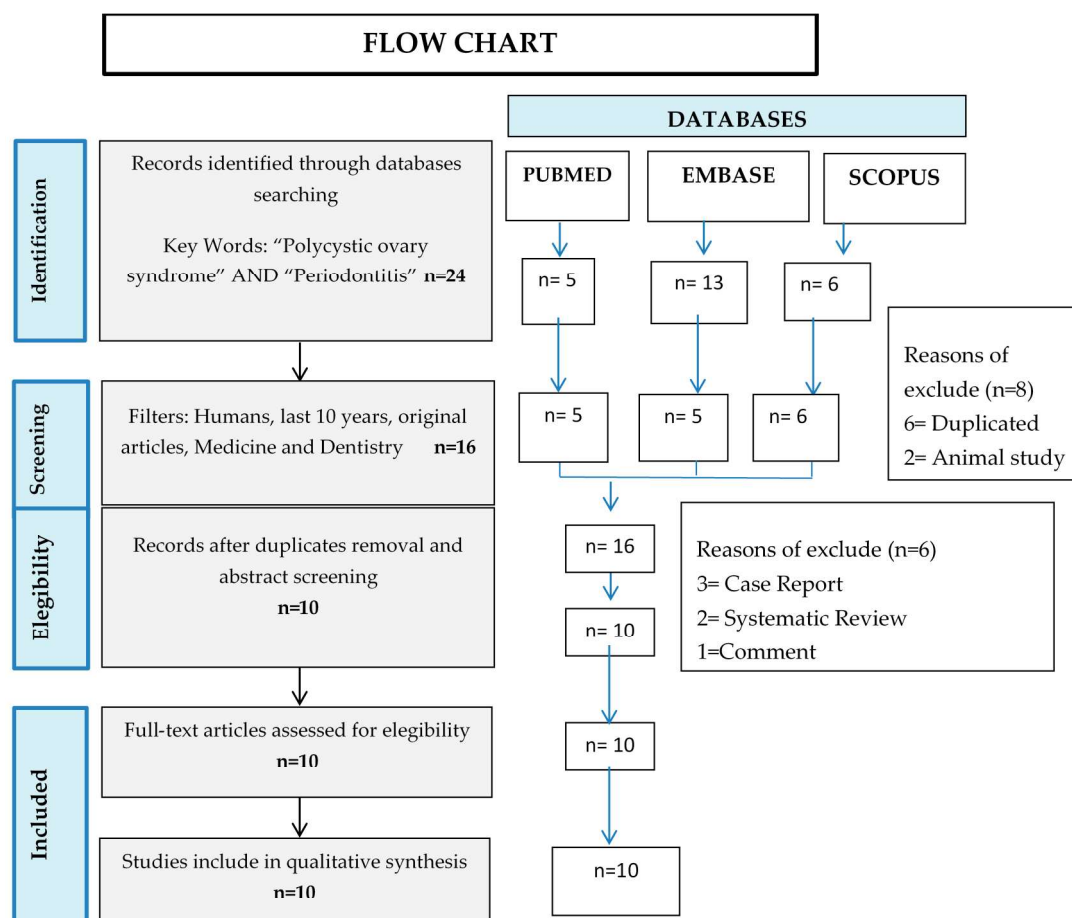


Figure 1. Flow chart of the selection of articles for the systematic review according to PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines.

2.3. Quality of Articles

To perform a critical reading of the studies that met all the selection criteria, the Critical Appraisal Skills Program (CASP) was used [20–22]. CASP consists of a checklist of 11 items organised in the following three sections: (A) Are the results of the study valid? (B) What are the results? and (C) Can these results help us in our environment/area? Each question that could be answered affirmatively added a point to the quality score allotted to the article. The maximum score was 11 points (Tables 1 and 2).

Table 1. CASP quality assessment of the reviewed case–control papers [19].

Authors, Year	Section A: Are the Results of the Trial Valid?						Section B: What are the Results?			Section C: Will the Results Help Locally?		Total Quality Score (0–11)
	Item 1	Item 2	Item 3	Item 4	Item 5	Item 6	Item 7	Item 8	Item 9	Item 10	Item 11	
Akcali A., 2014 [25]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Akcali A., 2015 [26]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Akcali A., 2017 [28]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Dursun E., 2011 [23]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Ozcaka O., 2012 [24]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Ozcaka O., 2013 [18]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Porwall S., 2014 [16]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Rahimnejad M., 2015 [27]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9
Saglam E., 2017 [29]	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No	Yes	9

Abbreviation: CASP, Critical Appraisal Skills Program. Item 1: Study issue is clearly focused; Item 2: Cohort is recruited in an acceptable way; Item 3: Exposure is accurately measured; Item 4: Outcome is accurately measured; Item 5: Confounding factors are addressed; Item 6: Follow-up is long and complete; Item 7: Results are clear; Item 8: Results are precise; Item 9: Results are credible; Item 10: Results can be applied to the local population; Item 11: Results fit with available evidence.

Table 2. CASP quality assessment of the reviewed randomised controlled trial papers [20].

Authors, Year	Section A: Are the Results of the Trial Valid?						Section B: What are the Results?		Section C: Will the Results Help Locally?			Total Quality Score (0–11)
	Item 1	Item 2	Item 3	Item 4	Item 5	Item 6	Item 7	Item 8	Item 9	Item 10	Item 11	
Deepti, 2017 [30]	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Treatment improved statistically ($p < 0.05$) PI, GI, BOP, PD, CAL.	$P < 0.001$ (in PI, GI, BOP, PD and CAL) Confidence Interval not available.	No	Yes	Yes	9

Abbreviation: CASP, Critical Appraisal Skills Program. Item 1: Study issue is clearly focused; Item 2: Was the assignment of patients to treatments randomised?; Item 3: Were all of the patients who entered the trial properly accounted for at its conclusion?; Item 4: Were patients, health workers, and study personnel “blind” to treatment?; Item 5: Were the groups similar at the start of the trial; Item 6: Aside from the experimental intervention, were the groups treated equally?; Item 7: How large was the treatment effect?; Item 8: How precise was the estimate of the treatment effect?; Item 9: Can the results be applied to the local population, or in your context?; Item 10: Were all clinically important outcomes considered?; Item 11: Are the benefits worth the harms and costs?. Periodontal parameters abbreviations: BOP, bleeding on probing; CAL, clinical attachment loss; GI, gingival index; PI, plaque index; PD, probing depth.

3. Results

Twenty-four articles were identified when the keywords were applied to the three databases: five in PubMed, 13 in Embase, and six in Scopus. We then applied the following filters: human studies; published in the last 10 years; full text available; and studies related to medicine and/or odontology. We removed six duplicated articles and two animal studies, thus rendering a new total of 16 articles. After reading the abstracts, we excluded three case reports, two systematic reviews, and one comment to the editor. Ten of these articles met all the selection criteria and answered the PICO question affirmatively. (Figure 1., flow chart of the systematic review according to PRISMA guidelines). Of these ten papers, nine were case–control studies [16,18,23–29] and one was a randomised clinical trial [30]. Table 3 shows the general characteristics of each of the articles. Table 1 shows the scores of the case–control studies, which reached a maximum score of 9/11. The scores represent the following items: study issues are clearly focused; cases are recruited in an acceptable way; exposure is accurately

measured; outcome is accurately measured; confounding factors are addressed; and results are clear and precise. When a critical reading was performed of the randomised clinical trial [30], a score of 9/11 points was obtained. The study issue was clearly focused, the assignment of patients to treatments was randomised, all the patients recruited for the trial were accounted for in the conclusion, the groups were similar at the beginning of the trial, the experimental and intervention group were treated equally, and the benefits were worth the harms and costs (Tables 1 and 2).

The design of the case and control study was that most often used to study periodontal disease and its relationship with PCOS. The sample size was 52 to 196 participants, and the average age of the subjects studied ranged from 21.0 to 28.6 years old (Table 3).

Table 3. General characteristics of the studies included in the systematic review.

Authors, Year	Study Design	Population	Mean Age in Years	Periodontal Status Diagnostic Methods	PCOS Diagnostic Methods	Confounders Variables Assessed
Akcali A., 2014 [25]	Case-control	N = 125 PCOS-Healthy = 45 PCOS-Gingivitis = 20 Healthy-Controls = 25 Healthy-Gingivitis = 20	25.7	Oral examination, PD, PI, BOP, Work Shop 1999 criteria, saliva and serum samples	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound	BMI > 30 kg/m ² , hyperandrogenism, high BP, CVD, DM, hyperprolactinemia, congenital adrenal hyperplasia, thyroid disorder, Cushing's syndrome, hepatic or renal dysfunction, oral contraceptives, steroid hormones, insulin-sensitizing medications
Akcali A., 2015 [26]	Case-control	N = 125 PCOS-Healthy = 45 PCOS-Gingivitis = 20 Healthy-Controls = 25 Healthy-Gingivitis = 20	25.7	Oral examination, PD, PI, BOP, Work Shop 1999 criteria, saliva and serum samples, MMP-8, MMP-I	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound Serum levels	BMI > 30 kg/m ² , hyperandrogenism, high BP, CVD, DM, hyperprolactinemia, congenital adrenal hyperplasia, thyroid disorder, Cushing's syndrome, hepatic or renal dysfunction, oral contraceptives, steroid hormones, insulin-sensitizing medications
Akcali A., 2017 [28]	Case-control	N = 125 PCOS-Healthy = 45 PCOS-Gingivitis = 20 Healthy-Controls = 25 Healthy-Gingivitis = 20	25.7	Oral examination, PD, PI, BOP, Work Shop 1999 criteria, saliva and serum samples	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound	BMI > 30 kg/m ² , hyperandrogenism, high BP, CVD, DM, hyperprolactinemia, congenital adrenal hyperplasia, thyroid disorder, Cushing's syndrome, hepatic or renal dysfunction, oral contraceptives, steroid hormones, insulin-sensitizing medications
Deepti 2017 [30]	Randomised controlled trail	N = 60 PCOS = 30 Controls = 30	PCOS = 24.0 Controls = 22.6	Oral examination, PI, GI, BOP, PD, CAL	Androgen Excess Society/2006 Criteria	Nephrotic syndrome, chronic renal failure, significant CVD, diabetes mellitus, active cancer, smokers and alcohol dependent, antibiotics, oral contraceptives in the last 3 months, periapical pathology/inflammatory conditions, periodontal treatment within 6 months prior to study

Table 3. Cont.

Authors, Year	Study Design	Population	Mean Age in Years	Periodontal Status Diagnostic Methods	PCOS Diagnostic Methods	Confounders Variables Assessed
Dursun E., 2011 [23]	Case-control	N = 52 PCOS-Non-obese = 25 Controls = 27	PCOS-non-obese = 22.7 Controls = 24.2	Oral examination, PD, CAL, GI, BOP, PI, Rx, GCF sample, Spectrophotometric, MPO assay	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound Serum levels	BMI > 30 kg/m ² , hyperprolactinemia, congenital adrenal hyperplasia, thyroid disorder, Cushing's syndrome, androgen-secreting tumours, smoking, oral contraceptives
Ozcaka O., 2012 [24]	Case-control	N = 73 PCOS-gingivitis = 30 PCOS-healthy = 31 Controls = 12	PCOS-gingivitis = 23.5 PCOS-healthy = 21.0 Controls = 28.5	Oral examination, PD, BOP, PI, saliva sample, GCF sample	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound Serum levels Ferriman Galloway score	BMI > 30 kg/m ² , androgen-secreting tumours, congenital adrenal hyperplasia, thyroid disorders, DM, hyperprolactinemia, Cushing's syndrome, high BP, hepatic and renal dysfunction, oral contraceptives, steroid hormones, insulin-sensitizing drugs, alcohol, smokers
Ozcaka O., 2013 [18]	Case-control	N = 73 PCOS-gingivitis = 30 PCOS-healthy = 31 Controls = 12	PCOS-gingivitis = 23.5 PCOS-healthy = 21.0 Controls = 28.5	Oral examination, PD, BOP, PI, saliva sample, GCF sample,	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound Serum levels Ferriman Galloway score	BMI > 30 kg/m ² , hyperandrogenism, thyroid disorders, hyperprolactinemia, CVD, DM, high BP, oral contraceptives, steroid hormone, insulin-sensitizing drugs
Porwal S., 2014 [16]	Case-control	n = 126 PCOS = 41 PCOS-treatment = 45 Healthy controls = 40	PCOS = 23.1 PCOS-treatment = 22.7 Healthy controls = 23.5	Oral examination, PD, PI, BOP, CAL, GI	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound Serum levels WC and WHR hsCRP serum level	BMI > 30 kg/m ² , thyroid disorders, hyperprolactinemia, androgen-secreting tumours, chronic inflammatory diseases, DM, CVD, cancer, smoking, alcohol, antibiotics, periodontal treatment, aggressive periodontitis
Rahimnejad ME., 2015 [27]	Case-control	n = 196 PCOS = 98 Healthy controls = 98	PCOS = 29.1 Healthy = 28.6	Oral examination, BOP, PD, CAL, PI, tooth loss American Academy of Periodontology Criteria	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound Serum levels	BMI > 25 kg/m ² , pregnancy, osteoporosis, antibiotics, smoking, periodontal treatment, malignancies
Saglam E., 2017 [29]	Case-control	n = 88 PCOS without CP = 22 PCOS with CP = 22 Healthy with CP = 22 Healthy without CP = 22	PCOS without CP = 27.6 PCOS with CP = 28.6 Healthy with CP = 28.2 Healthy without CP = 27.8	Oral examination, PD, CAL, GI, PI, BOP MDA level 8-OHdG level TAS	Medical History Rotterdam Criteria Ultrasound Serum levels WC and WHR	BMI > 25 kg/m ² , HbA1c > 6,5%, OGTT-2h > 200 mg/dL, not taken medication within the previous 3 months including antibiotics, oral contraceptives, steroid hormones, hypertensive medications, insulin-sensitizing drugs, periodontal therapy in the previous 6 months, androgen-secreting tumours, congenital adrenal hyperplasia, thyroid disorders, DM, hyperprolactinemia, Cushing's syndrome

Abbreviations: BMI, body mass index; BOP, bleeding on probing; BP, blood pressure; CAL, clinical attachment loss; CVD, cardiovascular disease; DM, diabetes mellitus; GCF, gingival crevicular fluid; GI, gingival index; MDA, malondialdehyde; MMP, matrix metalloproteinase; MPO, myeloperoxidase; OGTT-2h, 2 h oral glucose tolerance test; 8-OHdG, hidroxi-deoxi-guanosina; PCOS, polycystic ovary syndrome; PI, plaque index; PD, probing depth; TAS, total antioxidant status.

3.1. PCOS Diagnostic Criteria

In all studies, the medical clinical history of the patients was reviewed [16,23–30] and PCOS was diagnosed using the Rotterdam criteria of 2003 and the presence of at least one of the following: (A) polycystic ovaries (presence of >12 follicles measuring 2–9 mm diameter in each ovary and/or an increase in ovary volume > 10 mL); (B) oligo-ovulation and/or anovulation; and (C) hyperandrogenism (clinical and/or biochemical) [31]. One study [30], employed the 2006 criteria of the “Androgen Excess Society” [32], which considers hyperandrogenism (clinical and/or biochemical) as the key feature of PCOS, together with ovarian dysfunction (oligo-anovulation and/or polycystic ovaries) (Table 3).

3.2. Periodontal Diagnostic Criteria

The parameters evaluated in the different studies were measured with a periodontal probe calibrated in millimetres. The following measures were used during periodontal examination in all the articles: presence of dental plaque index (PI); average probing depth of the periodontal pockets (PD); and bleeding on probing (BOP) [16,23–30]. Clinical attachment level (CAL) was also measured in four studies [23,27,29,30] and three studies calculated the gingival index (GI) [23,29,30]. Only one study compared loss of teeth between PCOS women and controls [27] (Table 3).

3.3. Confounding Variables

Most of the studies considered the following confounding variables: obesity (BMI > 30 kg/m²), hyperandrogenism, high blood pressure (BP), CVD, diabetes, hyperprolactinemia, congenital adrenal hyperplasia, thyroid disorder, Cushing’s syndrome, hepatic or renal dysfunction, oral contraceptives, steroid hormones, and insulin-sensitizing medications. The presence of nephrotic syndrome, chronic renal failure, or periapical pathology was considered a confounding variable only in the clinical trial [30]. Since tobacco and alcohol are risk factors for periodontal disease, a smoking habit was taken into account in five of the studies [16,23,24,27,30] and drug and alcohol dependence was registered as part of the patient’s medical history in four studies. Only two studies included the presence of cancer as a confounding variable [16,30] (Table 3), while pregnancy and osteoporosis were included in one case–control study [27].

Previous periodontal treatment is also relevant when considering the association between periodontal status and PCOS. In this regard, Saglam et al. and Deepti et al. [29,30] included periodontal treatment within the 6 months prior to the study as a confounding variable, while another two studies recorded whether patients and controls had received previous periodontal treatment at any time in their lives [16,27] (Table 3).

3.4. Inflammatory and Oxidative Stress Parameters

Tumour necrosis factor α (TNF α) and interleukin (IL)-6 represent proinflammatory cytokines that modulate the inflammatory response during periodontal disease. Elevated levels—both in saliva and serum samples—of IL-6 and TNF α in females with PCOS [24] may be involved in IL-17 cytokine expression, which is thought to play a role in the pathogenesis of the disease. In this sense, a significant difference in IL-17A levels was also reported between PCOS subjects with or without gingivitis in serum, gingival crevicular fluid (GCF), and saliva [18]. The proinflammatory members of the IL-17 family may also contribute to the complexity of the inflammatory response in PCOS by influencing gingival inflammation [18]. Higher levels of high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) have been observed in serum and blood samples of PCOS patients with periodontal disease compared to periodically healthy PCOS patients [16,30]. Proinflammatory cytokines mediate the host response by inducing and activating the proteolytic function of neutrophils [33]. Activated neutrophils stimulate the production of MMP-9 and myeloperoxidase (MPO), which is considered a potent pro-oxidant, and, consequently, an indicator of oxidative stress. Previous studies have shown increased MPO levels in the GCF of patients with PCOS compared with healthy young women [23], while women with both PCOS and

gingivitis were reported to exhibit significantly higher serum levels of MPO and MMP-9 than otherwise systematically healthy women with gingivitis [28]. Other oxidative stress markers have also been the focus of research. Saglam et al. reported higher serum levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) and malondialdehyde (MDA) in female PCOS patients with or without CP compared to controls [29]. In terms of MMP-8, levels were found to be significantly higher in women with PCOS and gingivitis than in systemically healthy women with gingivitis. Significantly elevated MMP-8 levels in serum were also reported in periodontally healthy women with PCOS in relation to systemically healthy women with gingivitis [26].

3.5. Periodontal Microbiota

High levels of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* were found in saliva samples, and antibodies for *P. intermedia*, *P. gingivalis*, and *Streptococcus. oralis* were found in serum samples. Accordingly, *Prevotella. intermedia* levels were also significantly higher in women with PCOS and gingivitis compared to systemically or periodontally healthy women [25] (Table 2).

3.6. Periodontal Parameters

In all the selected articles, dental check-ups revealed a significantly higher value of PD and BOP in PCOS subjects than in controls [16,18,23–30]. At the same time, there were statistically significant differences in PI values between the two groups, with higher determinations being recorded in PCOS women. The CAL variable had been measured in five studies [16,23,27,29,30], in which GI was higher among PCOS subjects in three [23,29,30] (Table 4).

Table 4. Primary outcomes of the studies included in the systematic review.

Altered Parameters in Patients with PCOS and Periodontal Disease			
Authors	Clinical	Immunoinflammatory	Microbiological
Akcali A., 2014 [25]	PD, BOP, PI	NA	Saliva: <i>Porphyromona. gingivalis</i> <i>Fusobacterium nucleatum</i> Serum antibodies: <i>Prevotella. intermedia</i> , <i>Porphyromona gingivalis</i> , <i>Streptococcus oralis</i>
Akcali A., 2015 [26]	PD, BOP, PI	MMP-8/TIMP-1 ratio	NA
Akcali A., 2017 [28]	PD, BOP, PI	Salivary MMP-9 and neutrophil elastase, MMP-9/TIMP-1 ratio Serum MMP-9 and MPO	NA
Deepti 2017 [30]	PD, BOP, PI, CAL, GI	Serum hsCRP	NA
Dursun E. 2011 [23]	PD, GI, BOP, PI	MPO and NO in GCF	NA
Ozcaka O., 2012 [24]	PD, BOP, PI	IL-6 in GCF, saliva and serum, TNF α in saliva	NA
Ozcaka O., 2013 [18]	PD, BOP, PI	IL-17A, IL-F and IL-A/F in serum, IL-17A and IL-17F in GCF and saliva	NA
Porwall S., 2014 [16]	PD, BOP, CAL PCOS newly diagnosed without medical treatment had 2.88 times increased likelihood of having moderate periodontitis.	hsCRP	NA
Rahimnejad ME., 2015 [27]	BOP, PI, CAL	NA	NA
Saglam E., 2017 [29]	PD, BOP, PI, CAL, GI	Serum and salivary 8-OHdG, MDA and TAS levels	NA

Abbreviations: BOP, bleeding on probing; CAL, clinical attachment loss; GCF, gingival crevicular fluid; GI, gingival index; hsCRP, high sensitivity C-reactive protein; IL, interleukin; MDA: malondialdehyde; MMP, matrix metalloproteinase; MPO, myeloperoxidase; NA, not applicable; NO, nitric oxide; 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine; PCOS, polycystic ovary syndrome; PI, plaque index; PD, probing depth; TAS: total antioxidant status.

4. Discussion

In the present systematic review, we have confirmed a positive association between periodontal pathologies and PCOS, particularly gingivitis and CP. Periodontal examinations revealed that PD,

BOP, and PI were significantly higher in women with PCOS versus controls. In addition, CP was diagnosed by determining pathological CAL. This altered periodontal response in PCOS subjects was associated with a proinflammatory status that may have favoured the susceptibility of these patients to periodontal disease. These three parameters (PD, BOP, and PI) are markers of damage in periodontal tissue, though to confirm a diagnosis of periodontitis the presence of gingivitis with pseudopockets (false pockets) should be ruled out, as they can influence PD, PI, and BOP determinations. In this sense, several authors have introduced the CAL variable into their periodontal evaluation, since it measures insertion loss and thus represents the irreversibility of the process. In light of these data, patients with PCOS would appear to be more susceptible to developing periodontitis and other periodontal diseases, such as gingivitis, than women who do not suffer the pathology.

The studies in this review employed fairly clear criteria to assess the periodontal status of patients. At the same time, the diagnosis of PCOS was based on the Rotterdam criteria (a group of PCOS consensus workshops sponsored by ESHRE/ASRM, 2004) [31] and the “Ferriman Gallwey” escalation [18]. The fact that there was uniformity among the criteria for diagnosing patients made it easier to compare the results of the different studies. All PCOS patients were newly diagnosed and of a similar age (from 21.0–28.6 years old). All the articles evaluated clinical and immunoinflammatory mediators in PCOS and healthy women, though only one considered the microbiological profile of saliva and serum antibodies [25].

The results of the present systematic review confirm that PCOS patients are more vulnerable to develop periodontal diseases such as gingivitis and periodontitis. Dursun et al. were the first to report an association between periodontal disease and PCOS [23]; however, since then, only a limited number of studies have further explored this association. Periodontal diseases are infectious, and therefore trigger a local inflammatory response that is maintained over time in the case of periodontitis. Özçaka et al. determined that PCOS could influence gingival inflammation by altering IL-17 [18]. In PCOS patients, this local inflammation is further exacerbated by systemic inflammation. Among other factors, alteration of the lipid profile, which is characteristic of PCOS patients, triggers the release of proinflammatory cytokines such as $TNF\alpha$, thereby contributing to the pathogenesis of periodontal disease [34,35]. In this sense, Özçaka et al. reported an increased inflammatory response in PCOS patients with gingivitis compared to healthy patients with gingivitis, detecting lower levels of IL-6 in saliva, serum, and GCF, and an increase in salivary $TNF\alpha$ levels in the former group [24]. Porwal et al. observed that women with PCOS displayed higher measures of periodontal inflammation and breakdown than women without PCOS, thus demonstrating an increased prevalence and likelihood of suffering periodontitis in the former [16]. It is thought that a high level of hsCRP in the blood represents an increased risk of heart attack [36]. In PCOS patients with periodontal disease, an increase in systemic hsCRP levels has been observed [16,30], pointing to a synergistic etiologic factor which may be mediated periodontally.

These responses are associated with the induction of other mediators such as MPO and neutrophil elastase [28]; both synthesised by neutrophils, which play a central role in the initial host inflammatory response against periodontal pathogens. These mediators promote and intensify local and systemic inflammation, the stimulation of MMPs, loss of attachment, and bone resorption [26,28]. Furthermore, chronic periodontitis in patients with PCOS has been associated with an increase in oxidative stress markers in serum and saliva, and a decrease in total antioxidant status levels in serum, which contribute to increased oxidative stress [29].

In 2014, Akcali et al. carried out the first study to investigate the association between oral microbiota in saliva and serum antibody responses and gingival inflammation in PCOS [25]. They reported some differences in microbiological components between PCOS patients and controls with periodontal disease. PCOS patients with gingivitis displayed higher levels of *P. gingivalis* and *F. nucleatum* in saliva samples, and antibodies for *P. intermedia*, *P. gingivalis*, and *S. oralis* in serum [25]. As a systemic endocrine condition, PCOS may quantitatively affect the composition of oral microbiota and thus attribute to the enhanced systemic response to selective members of this microbial community.

5. Conclusions

To summarise, the results of the present systematic review support an association between periodontal disease and PCOS, as we confirm that periodontal parameters are altered more frequently in PCOS patients than in healthy young women, especially when gingivitis and CP are present. This response could be initially mediated by a local and systemic proinflammatory environment—a pathophysiological mechanism common to both diseases—that favours a pro-oxidant status, thus leading to oxidative stress and eventually to an irreversible destruction of periodontal tissue. We have previously established an association between oxidative stress markers and PCOS [13] and CP [37] in independent studies; however, it is unclear how these two pathologies interact synergistically to exacerbate the burden on cellular pathways. In this context, additional research is warranted in order to clarify the relationship between PCOS and periodontal diseases.

Author Contributions: Conceptualization, M.R. and F.J.S.; investigation and methodology, C.F.M.-A., J.S.-R., L.G.-C. and M.M.-H.; formal analysis, C.F.M.-A. and M.R.; writing—original draft preparation, C.F.M.-A.; writing—review and editing, M.R. and F.J.S.; visualization, C.F.M.-A.; funding acquisition, M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grant PI19/00437, from Carlos III Health, and has been co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”) and PROMETEO/2019/027 from the Valencian Regional Ministry of Education. No external funding, apart from the support of the authors’ institution, was available for this study.

Acknowledgments: The authors acknowledge the editorial assistance of Brian Normanly (CIBERehd). CFM-A is a recipient of a predoctoral fellowship from Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU18/00854).

Conflicts of Interest: The authors declare no potential conflict of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

References

1. Khosravi, R.; Ka, K.; Huang, T.; Khalili, S.; Nguyen, B.H.; Nicolau, B.; Tran, S. Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-6: Potential Interorgan Inflammatory Mediators Contributing to Destructive Periodontal Disease in Obesity or Metabolic Syndrome. *Mediators Inflamm.* **2013**, *2013*, 1–6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Escudero-Castaño, N.; Perea-García, M.A.; Bascones-Martínez, A. Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Av. Periodoncia Implantol. Oral* **2008**, *20*, 29–34.
3. Oppermann, R.V.; Weidlich, P.; Musskopf, M.L. Periodontal disease and systemic complications. *Braz. Oral Res.* **2012**, *26*, 39–47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Uriarte, S.M.; Edmisson, J.S.; Jimenez-Flores, E. Human neutrophils and oral microbiota: A constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence. *Immunol. Rev.* **2016**, *273*, 282–298. [[CrossRef](#)]
5. Hajishengallis, G. The inflammophilic character of the periodontitis-associated microbiota. *Mol. Oral Microbiol.* **2014**, *29*, 248–257. [[CrossRef](#)]
6. Pihlstrom, B.L.; Michalowicz, B.S.; Johnson, N.W. Periodontal diseases. *Lancet* **2005**, *19*, 1809–1820. [[CrossRef](#)]
7. Tsai, C.-Y.; Tang, C.Y.; Tan, T.-S.; Chen, K.-H.; Liao, K.-H.; Liou, M.-L. Subgingival microbiota in individuals with severe chronic periodontitis. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **2016**, *51*, 226–234. [[CrossRef](#)]
8. Wisse, B.E. The Inflammatory Syndrome: The Role of Adipose Tissue Cytokines in Metabolic Disorders Linked to Obesity. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2004**, *15*, 2792–2800. [[CrossRef](#)]
9. Bullon, P.; Newman, H.N.; Battino, M. Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: A shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction? *Periodontology 2000* **2014**, *64*, 139–153. [[CrossRef](#)]
10. Borrell, L.N.; Papapanou, P.N. Analytical epidemiology of periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2005**, *32*, 132–158. [[CrossRef](#)]
11. Linden, G.J.; Lyons, A.; Scannapieco, F.A. Periodontal systemic associations: Review of the evidence. *J. Clin. Periodontol.* **2013**, *40*, S8–S19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Kakoly, N.; Moran, L.; Teede, H.; Joham, A. Cardiometabolic risks in PCOS: A review of the current state of knowledge. *Expert Rev. Endocrinol. Metab.* **2019**, *14*, 23–33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

13. Victor, V.M.; Rocha, M.; Bañuls, C.; Alvarez, A.; De Pablo, C.; Sanchez-Serrano, M.; Gomez, M.; Hernandez-Mijares, A. Induction of Oxidative Stress and Human Leukocyte/Endothelial Cell Interactions in Polycystic Ovary Syndrome Patients with Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 3115–3122. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Souza dos Santos, A.C.; Soares, N.P.; Costa, E.C.; de Sá, J.C.F.; Azevedo, G.D.; Lemos, T.M.A.M. The impact of body mass on inflammatory markers and insulin resistance in polycystic ovary syndrome. *Gynecol. Endocrinol.* **2015**, *31*, 225–228. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Victor, V.M.; Rovira-Llopis, S.; Bañuls, C.; Diaz-Morales, N.; Martinez de Marañon, A.; Rios-Navarro, C.; Alvarez, A.; Gomez, M.; Rocha, M.; Hernández-Mijares, A. Insulin Resistance in PCOS Patients Enhances Oxidative Stress and Leukocyte Adhesion: Role of Myeloperoxidase. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151960. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Porwal, S.; Tewari, S.; Sharma, R.K.; Singhal, S.R.; Narula, S.C. Periodontal Status and High-Sensitivity C-Reactive Protein Levels in Polycystic Ovary Syndrome with and without Medical Treatment. *J. Periodontol.* **2014**, *85*, 1380–1389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Martinez-Herrera, M.; Silvestre, F.J.; Silvestre-Rangil, J.; Bañuls, C.; Rocha, M.; Hernández-Mijares, A. Involvement of insulin resistance in normoglycaemic obese patients with periodontitis: A cross-sectional study. *J. Clin. Periodontol.* **2017**, *44*, 981–988. [[CrossRef](#)]
18. Özçaka, Ö.; Buduneli, N.; Ceyhan, B.O.; Akcali, A.; Biçakci, N.; Lappin, D.F.; Buduneli, N. Is Interleukin-17 Involved in the Interaction between Polycystic Ovary Syndrome and Gingival Inflammation? *J. Periodontol.* **2013**, *84*, 1827–1837.
19. Hutton, B.; Catalá-López, F.; Moher, D. The PRISMA statement extension for systematic reviews incorporating network meta-analysis: PRISMA-NMA. *Med. Clin.* **2016**, *147*, 262–266. [[CrossRef](#)]
20. Zeng, X.; Zhang, Y.; Kwong, J.S.W.; Zhang, C.; Li, S.; Sun, F.; Niu, Y.; Du, L. The methodological quality assessment tools for preclinical and clinical studies, systematic review and meta-analysis, and clinical practice guideline: A systematic review. *J. Evid. Based Med.* **2015**, *8*, 2–10. [[CrossRef](#)]
21. CASP. Clinical Appraisal Skills Program Chort Study Checklist. 2018. Available online: <https://casp-uk.net/wp-content/uploads/2018/01/CASP-Case-Control-Study-Checklist-2018.pdf> (accessed on 12 January 2019).
22. CASP. Clinical Appraisal Skills Program Randomised Controlled Trial. 2018. Available online: <https://casp-uk.net/wp-content/uploads/2018/01/CASP-Randomised-Controlled-Trial-Checklist-2018.pdf> (accessed on 12 January 2019).
23. Dursun, E.; Akaln, F.A.; Güncü, G.N.; Çınar, N.; Aksoy, D.Y.; Tözüm, T.F.; Kılınç, K.; Yıldız, B.O. Periodontal disease in polycystic ovary syndrome. *Fertil. Steril.* **2011**, *95*, 320–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Özçaka, Ö.; Ceyhan, B.Ö.; Akcali, A.; Biçakci, N.; Lappin, D.F.; Buduneli, N. Is There an Interaction Between Polycystic Ovary Syndrome and Gingival Inflammation? *J. Periodontol.* **2012**, *83*, 1529–1537. [[CrossRef](#)]
25. Akcali, A.; Bostanci, N.; Özçaka, Ö.; Öztürk-Ceyhan, B.; Gümüş, P.; Buduneli, N.; Belibasakis, G.N. Association between polycystic ovary syndrome, oral microbiota and systemic antibody responses. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e108074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Akcall, A.; Bostanci, N.; Özçaka, Ö.; Öztürk-Ceyhan, B.; Gümüş, P.; Tervahartiala, T.; Husu, H.; Buduneli, N.; Sorsa, T.; Belibasakis, G.N. Elevated matrix metalloproteinase-8 in saliva and serum in polycystic ovary syndrome and association with gingival inflammation. *Innate Immun.* **2015**, *21*, 619–625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Rahiminejad, M.E.; Moaddab, A.; Zaryoun, H.; Rabiee, S.; Moaddab, A.; Khodadoust, A. Comparison of prevalence of periodontal disease in women with polycystic ovary syndrome and healthy controls. *Dent. Res. J.* **2015**, *12*, 507–512.
28. Akcali, A.; Bostanci, N.; Özçaka, Ö.; Gümüş, P.; Öztürk-Ceyhan, B.; Tervahartiala, T.; Husu, H.; Buduneli, N.; Sorsa, T.; Belibasakis, G.N. Gingival Inflammation and Salivary or Serum Granulocyte-Secreted Enzymes in Patients with Polycystic Ovary Syndrome. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 1145–1152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Saglam, E.; Canakci, C.F.; Sebin, S.O.; Saruhan, N.; Ingeç, M.; Canakci, H.; Sezer, U. Evaluation of Oxidative Status in Patients with Chronic Periodontitis and Polycystic Ovary Syndrome: A Cross-Sectional Study. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, 76–84. [[CrossRef](#)]
30. Deepti, S.; Tewari, S.; Narula, S.C.; Singhal, S.R.; Sharma, R.K. Effect of Non-surgical Periodontal Therapy Along with Myo-Inositol on High Sensitivity C-Reactive Protein and Insulin Resistance in Polycystic Ovary Syndrome Women Having Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Trial. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 999–1011. [[CrossRef](#)]

31. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS Consensus Workshop Group. Revised 2003 Consensus on Diagnostic Criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). *Hum. Reprod.* **2004**, *19*, 41–47. [[CrossRef](#)]
32. Azziz, R.; Carmina, E.; Dewailly, D.; Diamanti-Kandarakis, E.; Escobar-Morreale, H.F.; Futterweit, W.; Janssen, O.E.; Legro, R.S.; Norman, R.J.; Taylor, A.E.; et al. The Androgen Excess and PCOS Society criteria for the polycystic ovary syndrome: The complete task force report Task Force on the Phenotype of the Polycystic Ovary Syndrome of The Androgen Excess and PCOS Society*). *Fertil. Steril.* **2009**, *91*, 456–488. [[CrossRef](#)]
33. Figueredo, C.M.S.; Fischer, R.G.; Gustafsson, A. Aberrant Neutrophil Reactions in Periodontitis. *J. Periodontol.* **2005**, *76*, 951–955. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Ylöstalo, P.; Suominen-Taipale, L.; Reunanen, A.; Knuuttila, M. Association between body weight and periodontal infection. *J. Clin. Periodontol.* **2008**, *35*, 297–304. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Genco, R.J.; Grossi, S.G.; Ho, A.; Nishimura, F.; Murayama, Y. A Proposed Model Linking Inflammation to Obesity, Diabetes, and Periodontal Infections. *J. Periodontol.* **2005**, *76*, 2075–2084. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Al Aseri, Z.; Habib, S.S.; Marzouk, A. Predictive value of high sensitivity C-reactive protein on progression to heart failure occurring after the first myocardial infarction. *Vasc. Health Risk Manag.* **2019**, *15*, 221–227. [[CrossRef](#)]
37. Martinez-Herrera, M.; López-Domènech, S.; Silvestre, F.J.; Silvestre-Rangil, J.; Bañuls, C.; Victor, V.M.; Rocha, M. Chronic periodontitis impairs polymorphonuclear leucocyte–endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 1429–1439. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Journal section: *Odontostomatology for the disabled or special patients*
Publication Types: *Research*

doi:10.4317/jced.59266
<https://doi.org/10.4317/jced.59266>

Dental treatment under general anesthesia in mentally disabled patients based on an ambulatory surgery model: A Case-control study

Cecilia-Fabiana Márquez-Arrico ¹, Julio Talaván-Serna ², Francisco-Javier Silvestre ^{1,3}, Juan Viñoles ⁴, Sandra Rodríguez-Martínez ⁵, Javier Silvestre-Rangil ³

¹ Stomatology Service, Hospital Universitario Dr. Peset-FISABIO

² Anesthesiology Unit, Obispo Polanco Hospital, Teruel, Spain

³ Department of Stomatology, University of Valencia, Spain

⁴ Anesthesiology Unit, University Hospital Dr. Peset, Valencia, Spain

⁵ Emergency Unit, Obispo Polanco Hospital, Teruel, Spain

Correspondence:

Dentistry and Medicine Faculty University of Valencia
C/ Gasco Oliag N°1 Valencia 46010 Spain
silranja@uv.es

Received: 08/12/2021
Accepted: 10/01/2022

Márquez-Arrico CF, Talaván-Serna J, Silvestre FJ, Viñoles J, Rodríguez-Martínez S, Silvestre-Rangil J. Dental treatment under general anesthesia in mentally disabled patients based on an ambulatory surgery model: A Case-control study. J Clin Exp Dent. 2022;14(2):e192-8.

Article Number: 59266 <http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm>
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
eMail: jced@jced.es
Indexed in:
Pubmed
Pubmed Central® (PMC)
Scopus
DOI® System

Abstract

Background: Mentally disabled patients commonly offer little or no cooperation in dental treatments, and general anesthesia may become necessary in such cases. The present study was to identify the most relevant factors in dental treatment under general anesthesia in disabled patients based on a Major Ambulatory Surgery (MAS) model. The study analyzes anesthetic variables and type of dental procedures carried out for disabled patients compared with controls.

Material and Methods: A case-control study was carried out with 574 patients (263 cases and 311 controls) subjected to dental treatment under general anesthesia in the Day Surgery Unit of Dr. Peset University Hospital (Valencia, Spain). Epidemiological, anthropometric and preoperative data (ASA score, Mallampati classification) were collected.

Results: Males and obesity were more prevalent among disabled patients than controls. Significant associations were found between longer surgery time, underwent tooth extraction, tartrectomy, fillings and disabled patients treated under general anesthesia. The preoperative risk scores were likewise higher in disabled patients (ASA III-IV). The duration of surgery increased with the ASA score but didn't influence postoperative stay. Patient condition in the first 24 hours of late postoperative recovery was good in both groups.

Conclusions: Dental treatment based on the MAS in mentally disabled patients is effective and safe, even in individuals with a certain prior risk (ASA III).

Key words: *Disabled patients, ambulatory surgery, dental treatment, special needs, Major Ambulatory Surgery by general anesthesia.*

Introduction

Dental treatment on disabled patients is often difficult because of their behavior (depending on collaboration) general health status, the medication used to treat their pathologies, and social condition (1). The World Health Organization (WHO) proposes the following definition of disabilities: is an umbrella term, covering impairments, activity limitations, and participation restrictions Disability is thus not just a health problem, but a complex phenomenon, reflecting the interaction between features of a person's body and features of the society in which he or she lives (2,3).

Patients with functional problems may present different degrees of mental impairment that pose a challenge for dental treatment (3). On the other hand, deficiencies and limitations of a medical, economical, social, and behavioural nature complicate the access of these patients to conventional dental care, and special clinical management measures may be required, including the correction of behaviour, physical stabilization or premedication in order to perform the dental treatment (3).

Oral problems affect practically all individuals with mental disabilities - the prevalence being clearly higher than that found in the general population (4). Disabled patients can present a higher incidence of disorders such as caries (4) and gingivitis or periodontitis (1,5-7), due to a lack of cooperation and deficient dental hygiene which often needs to be performed on an assisted basis. The presence of malocclusions is also frequent (5). Disabled patients frequently present dental trauma, drooling and negative habits such as bruxism (8). In some cases, self-injuring practices such as chronic nibbling can be seen, resulting in important oral mucosal lesions (8). In relation to dental treatment, mentally disabled patients commonly offer little or no cooperation, and general anesthesia in the operating room may become necessary in these cases (9).

Dental procedures are a frequently reason for general anesthesia in children. These procedures vary in duration from a few minutes for removal of a tooth, to a few hours for dental restoration procedures. Guidelines limit the degree of sedation during treatment in the dental chair, and complex work in anxious or young children is performed in a hospital under general anesthesia. Major Ambulatory Surgery (MAS) programs in dental care have afforded great benefits for patients with special needs, children, and particularly for patients with severe mental disabilities since treatment can be carried out under general anesthesia or deep sedation. In the specific case of patients with severe mental disabilities, dealing with them outside their usual surroundings can be problematic because of their behavioral disorders, since hospital wards are usually not prepared to receive such patients. Nevertheless, treatment under general anesthesia and in the hospital setting affords greater safety and

efficacy, resulting in greater quality patient care (10). To sum up, very few studies have been published on the procedures and protocols required for dental treatment under general anesthesia among patients with special needs (11,12). Thus, the aim of this study was to identify the most relevant factors in dental treatment under general anesthesia in disabled patients based on a MAS model.

Material and Methods

-Study Sample

A case-control study was carried out with 574 patients males and females patients aged between 3 and 89 years old subjected to dental treatment under general anesthesia in the Day Surgery Unit of Dr. Peset University Hospital (Valencia, Spain) in the period between 2014-2018. The cases group consisted of 263 mentally disabled patients in which handling problems precluded conventional treatment under local anesthesia with correction of behavior, physical restraints or premedication. The control group consisted of 311 patients without disabilities that were seen in the Stomatology Outpatient Clinic due to impacted third molars, cysts or lesions requiring surgical treatment under general anesthesia. Likewise, there were some patients with intense preoperative anxiety requiring general anesthesia or deep sedation for correct dental treatment (Table 1).

-Study Design

These subjects were referred to the Stomatology Unit of the hospital from two dental clinics specialized in the care of patients of this kind (Red Cross dental clinic for special needs patients in Valencia, and dental clinic of the University of Valencia). The hospital Ethics Committee approved the study. Epidemiological data such as age and gender were recorded of a patient's clinical data and medical history, along with anthropometric parameters such as weight, height, body mass index (BMI), and the presence of overweight and obesity.

Pre-anesthesia assessment included a good history, a physical examination performed by the anesthesiologist (electrocardiogram, radiographs, consultations) and any indicated laboratory tests. Preoperative data were compiled, including anesthesia risk according to the American Society of Anesthesiologists (ASA) score and the Mallampati classification for preoperative airway assessment. The types of treatment were recorded, i.e., tartrectomy, fillings, extractions and oral surgery (impacted teeth, cysts, etc.), and we documented the number of extractions per patient, as well as the number of fillings. The data were recorded in medical histories by the doctors who perform the interventions

The appearance of post-treatment complications was evaluated, along with the "postoperative indicator" – a telephone survey score systematically used by the Day Surgery Unit (DSU) of our hospital to assess patient

Table 1: Characteristics of Study Sample.

VARIABLE#	GLOBAL	CASES	CONTROLS	P-value
Age (years)	30 ± 16.6	27.6 ± 17.0	32.2 ± 16.0	0.001* (T test)
Gender				
Males (females)	49.3% (50.7%)	57.4% (42.6%)	45.0% (55%)	0.003*(chi-sq test)
Weight (kg)	62.5 ± 21.4	58.6 ± 24.5	65 ± 18.1	<0.001*(T test)
Height (cm)	162.2 ± 16.7	155.9 ± 19.4	165.8 ± 13.6	<0.001*(T test)
Body mass index	24.1 ± 5.6	23.9 ± 7.0	24.1 ± 4.6	0.763(T test)
Obesity	13.6%	20.5%	9.5%	0.002*(chi-sq test)
ASA score (%)				
ASA I	37.6	5.7	64.6	<0.001*(chi-sq test)
ASA II	51	72.6	32.8	
ASA III	11	20.9	2.6	
ASA IV	0.3	0.8	0	
Mallampati score (%)				
I	43.8	29.5	55	<0.001*(chi-sq test)
II	44.7	49.2	41.2	
III	10.6	20.5	2.9	
IV	0.9	0.8	1.0	

ASA: American Society of Anesthesiologists; Kg: kilograms; min: minutes.
#Mean values. **p*<0,05 was statistically significant.

condition in the first 24 hours of late postoperative recovery at home (13). The indicator is applied to all types of surgery in the DSU, and is based on the simple sum of four specific items: bleeding, general condition, pain, and tolerance. The items are scored ranging from negative values in the case of poor patient evolution (need for medical care) to values between 4 and 8 reflecting a normal postoperative course. Surgery time and the duration of stay in the DSU were also analyzed.

-Statistical Analysis

Continuous variables were reported as the mean and standard deviation (SD), and categorical variables as absolute frequencies and percentages. The Student t-test for independent samples was used to assess homogeneity between the groups (means of cases and controls), while the chi-squared test was used to measure the degree of dependency between categorical variables, and the Fisher exact test was applied for 2 x 2 comparisons. Analysis of variance (ANOVA) was used to contrast means referred to surgery time and duration of stay in the DSU, according to the ASA score and adjusted for age and gender. Multiple comparisons were made using the Bonferroni correction. Multiple linear regression analysis was used to explore the relationship between the postoperative indicator scores and the surgical and postoperative times adjusted for age and gender. Binary

logistic regression analysis, in turn, estimated the odds ratios (ORs) of the associations of the different factors. The level of statistical significance was established as 5% (*α*=0.05). The SPSS version 19.0 (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA) was used throughout.

Results

-Characteristics of Study Sample

Descriptive statistics showed that the controls were older (*p*=0,001) on average than the disabled patients (32.2±16.0 vs. 27.6±17.0 years, respectively). However, there were comparatively more patients under 20 years old in the group of disabled patients, and more patients between 21-29 years old range than in the control group (40.3% versus 30%). There was a greater presence of females in the control group (55% versus 42.6%; *p*=0.003). A slight male predominance was observed in the global cohort (50.7%; *p*=0,003) (Table 1).

With regard to the anthropometric parameters, mean body weight was greater in the control group (65.6±18.1 versus 58.6±24.5 kg; *p*<0.001), in the same way as body height (165.8±13.6 versus 155.9±19.4 cm; *p*<0.001). However, no differences were observed between the groups in terms of BMI (global mean 24.1±5.6 kg/m²). Obesity was globally more prevalent in disabled patients (20.5% versus 9.5%; *p*=0.002). However, these patients

were characterized by a great variability of BMI – some individuals presenting very low BMI and others very high values.

-Results of Anesthetic Variables

In relation to the preoperative ASA score, 64.6% of the controls were ASA I and 32.8% ASA II. In comparison, the disabled patients were more widely distributed among ASA I (5.7%), ASA II (72.6%), ASA III (20.9%) and ASA IV (0.8%) – with clear differences between the groups ($p<0.001$). The Mallampati score in the group of disabled patients was higher than in the control group, with greater difficulty for securing airway control (Table 1).

General anesthesia was the anesthetic technique most frequently used in disabled patients (98.1% versus 75.6% in the control group, $p<0.001$). One-third of the controls were subjected to monitored anesthetic care with intravenous sedation and local anesthesia (Fig. 1). The mean surgery time in the control group was 92.0 ± 38.7 min, and was significantly longer among the disabled patients (121.6 ± 43.7 min, $p<0.001$) – this was reflecting the need for more time to complete treatment in patients with mental disabilities. However, the mean postoperative stay in the DSU was 118.8 ± 48.3 min among the controls and similar in the disabled patients (121.3 ± 49.6 min, $p=0,570$). The relationship between surgery time and the duration of admission to the DSU showed abriefer surgery being associated with a shorter stay in the DSU (Fig. 1).

The surgery time in the global sample was seen to increase with the ASA score ($p<0.001$). Specifically, surgery time increased 25 min between ASA I and ASA II, and also between ASA II and the patients with ASA III

and IV. However, considering the duration of stay in the DSU, the values were more homogeneous among the different ASA scores, i.e., the latter did not influence the duration of stay in the DSU ($p=0.845$) (Fig. 1)

The postoperative indicator could not be established in 1.4% of the global series (evenly distributed between the two groups), because telephone contact with the patient or caregivers did not prove possible. In relation to this indicator, it must be noted that the general condition score was much lower among the controls than in the mentally disabled patients. Only in the case of pain were the scores seen to be significantly lower among the disabled patients than in the controls ($p=0,001$).

The mean score corresponding to the four items of the postoperative indicator was 5.75 ± 1.88 in the global sample, 5.51 ± 1.92 in the controls, and 6.04 ± 1.80 among the disabled patients. In the global study sample, negative postoperative indicator scores were only recorded on two occasions, corresponding to patients who return to hospital after having been discharged home. In one case the reason was to be in pain (with patient discharge home from the emergency room) and in the other was post-extraction bleeding (with admission to hospital).

-Results of Dental Procedures Carried Out

Dental cleaning with ultrasound was carried out in 63.6% of the disabled patients. Fillings were also very commonly performed in these subjects (69.6%), in contrast to the control group ($p=0,001$), where practically no fillings were made. The mean number of fillings per patient in the cases group was 3.53 while for patients in the control group was 0,9 (Fig. 2).

The prevalence of simple extractions (including third

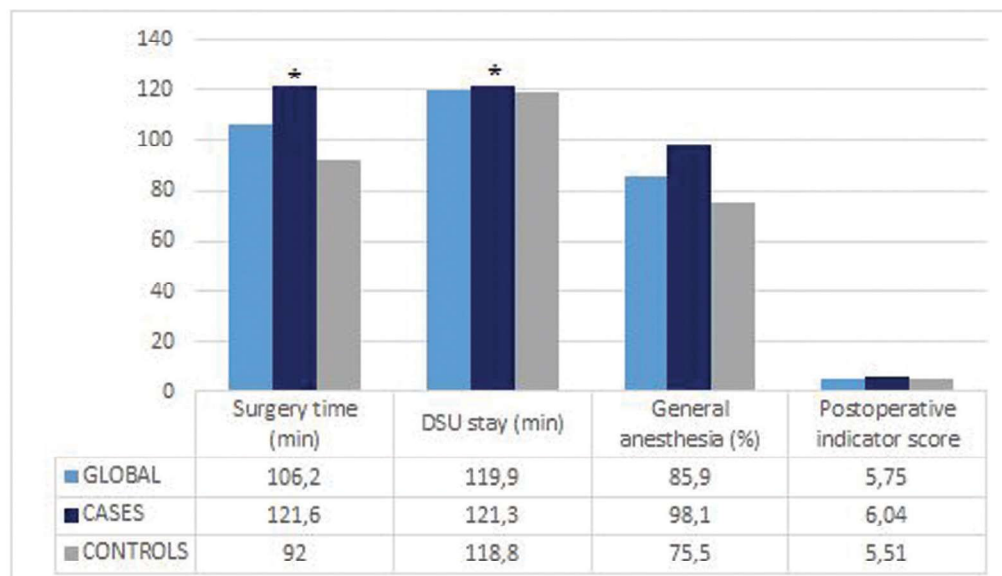


Fig. 1: Anesthetic variables. * $p<0,001$ T test was used to compare surgery time and DSU stay between cases and controls. Chi-sq test was used to compare postoperative indicator score and DSU: Day Surgery Unit between cases and controls.

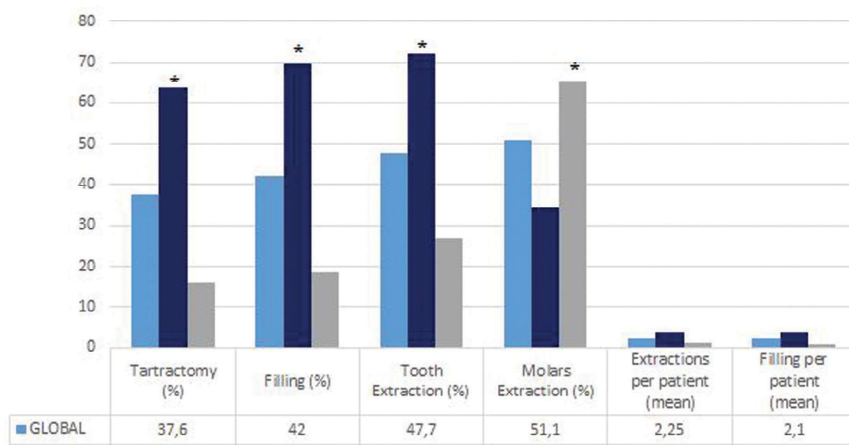


Fig. 2: Dental procedures carried out. * $p < 0,001$. Chi-sq test was used to compare the percentage of tartrectomy, filling, tooth extraction and molars extraction carried out between cases and controls. T test was used to compare the number of extractions per patient and filling per patient between cases and controls.

molars) was 27% in the control group and 72.2% among the disabled patients ($p=0,001$). The number of extractions per patient was 2.25 ± 3.95 for the global cohort (1.15 in the control group and 3.56 in the disabled patients, $p=0,001$). Overall, third molar surgery accounted for over half of all treatments (51.1%), though it proved significantly more frequent in the control group (65.3%) than among the disabled patients (34.2%, $p < 0.001$). In the control group, molar extractions were more frequent (65,3% control and 34,4% cases, $p=0,001$) in individuals with lower ASA scores and in the 30-39 years old age range. The frequency of tartrectomy was seen to decrease as patient age increased, and was found to be greater among younger individuals and in those with higher ASA scores. In relation to the types of treatment and the ASA score, the number of extractions was seen to increase with age and was higher in patients with ASA III and IV than in those with ASA II. The number of fillings also increased with age, though up until 40 years old of age the ASA I patients required fewer fillings than those with higher ASA scores ($p < 0.001$).

Discussion

The present study compared two cohorts of patients (mentally disabled patients and controls) referred for dental treatment in a DSU, based on a MAS model. Although the two groups were comparable, the controls programmed for oral surgery were somewhat older than the disabled patients and had a greater prevalence of females. With regard to the anthropometric variables, no differences were observed between the two groups in terms of BMI, though important variability was observed among the disabled patients – with both obese individuals and patients with very low BMI values. The evaluation of anesthetic risk based on the ASA score showed the disabled patients to have a clearly greater

risk than the controls, in concordance with the observations of other authors (13). However, and in coincidence with other studies, this increased anesthetic risk did not cause any patient to be excluded from treatment under general anesthesia (14).

All of the patients with mental disabilities were treated under general anesthesia due to deficient cooperation and the clinical management problems they posed. In contrast, one-third of the controls were treated under intravenous sedation and with local anesthesia, since the management of these patients was clearly easier. The disabled individuals were referred from two specialized clinics for patients of this kind. Only one-third of the patients seen in these clinics were referred to our center for treatment under general anesthesia, being this proportion very low in comparison with data found in the literature (15,16). A possible explanation for this is that such patients had already been previously evaluated in the mentioned clinics by dentists specialized in cases of this kind, and most of those who were not referred to our center could be treated following correction of behavior, physical restraints or premedication. In contrast, patients who were referred presented cognitive disturbances, severe mental retardation or aggressive behavior, in line with the observations of other investigators (17-19). A frequent problem with these patients referred for treatment under general anesthesia is that it is not possible to perform prior oral explorations or complementary tests such as panoramic X-rays, due to the important management problems they pose. In order to do a preoperative planification, it could be interesting to carry out a dental check up using conscious sedation with midazolam. On the other hand, controls were referred from the hospital outpatient clinic for procedures such as the extraction of impacted teeth, maxillary cyst removal or oral soft tissue surgery. Most of the disabled patients were recei-

ving dental treatment for the first time (20), having been selected for general anesthesia due to the impossibility of using other treatment techniques on an ambulatory basis. In almost two-thirds of the cases, the treatments required by the disabled patients were extractions and fillings due to caries being consistent with the observations of other authors (9-21). A lesser proportion required dental cleaning or nonsurgical periodontal treatment. In this subgroup, only one-third required molar extractions.

It must be taken into account that in the case of doubt as to whether restorative treatment might fail, direct extraction was decided in mentally disabled patients because of the complexity and risk of complications associated with possible retreatment procedures under general anesthesia in these individuals (22). In some studies, 10% of the patients treated under general anesthesia required a second operation under general anesthesia (9). Some authors have even reported that 3% of the patients required a third treatment under general anesthesia in the course of follow-up (12). In general, the retreatment rate in the 5 years following the first treatment under general anesthesia is estimated to be 4-12%. However, in order to preserve the effects of initial treatment and avoid new oral lesions, these patients would have to be enrolled in a post-treatment prevention program with full implication on the part of the caregivers (12,20). In any case, the ideal strategy would be to adopt early prophylactic measures with the purpose of avoiding the number of extractions required by these patients in a later stage (14). Although different classifications of the types of treatments used and their duration have been proposed (12,22), most of them divide the patients into two groups: those requiring only extractions under general anesthesia, and those requiring fundamentally dental prophylaxis, fillings, and extractions. This has been the approach adopted in our study. Other types of dental procedures, such as root canal treatments in severely degraded posterior teeth, greatly complicate the timing and duration of treatment under general anesthesia and may result in restoration failure over the long term. Nevertheless, some authors perform endodontic treatments and restorations in a single step (23), as well as the placement of implants, with good results (24,25). Obviously, procedures involving the fitting of prostheses or orthodontics fall outside this scenario of treatment under general anesthesia.

The surgery times were longer in the disabled patients than in the control group due to two reasons: (a) the complexity of management of uncooperative disabled patients prolonged the anesthetic induction and education times; and (b) the need for combined surgical and dental procedures in one same surgical session (dental prophylaxis, fillings, and extractions or surgery). Nevertheless, the time to discharge home was similar in both groups. A possible explanation of this finding could be

that the public health system offers surgical procedures for all patients (disabled and non-disabled) but not restorative and preventive treatment for non-disabled patients. Following premedication in the form of oral midazolam, induction was carried out with inhaled anesthetics, and anesthesia was then completed via the intravenous route, with nasotracheal intubation and pharyngeal block using dressing impregnated in saline solution. Although nasotracheal intubation was used in most patients, in those cases in which the tube could not be advanced through the nasal passages, intraoral intubation was carried out first working on one side of the mouth and then shifting the tube to work on the other side.

We used the MAS model because it allows safe and efficient treatment of these previously well-selected patients, without the need for the hospital admission. The model makes it possible to shorten the traumatic period for which the patients are removed from their usual environment (family or institution), with a lesser risk of nosocomial infection, and avoiding the complex in-hospital management difficulties these patients pose. The model moreover guarantees the availability of a supporting hospital for the continuation of patient care if needed (26,27). Furthermore, telephone follow-up of the postoperative condition of the patient is made 5 hours after discharge home.

Postoperative complications are not frequent (28,29) though Escamilla-Casal (30) reported a higher rate of complications (bleeding and drowsiness) in a study of children with mental disabilities. In contrast, in our postoperative analysis, over one-half of the patients in both groups showed optimum tolerance and minimum bleeding. Only a small percentage (7%) showed tolerance problems due to nausea, with equal distribution between both groups. With regard to pain following discharge home, the disabled patients showed better scores than the controls. This may have been because surgical aggression was generally less severe in disabled patients than in the controls subjected to oral surgery. Moreover, patients with mental disabilities may have more difficulties in expressing low-intensity pain sensation. In fact, pain intensity was interpreted by the caregivers and reported to the nurse making the telephone call – a circumstance that may produce information bias.

To summarize, it must be taken into account that our study was carried out in a public general hospital in which the different procedures are highly standardized. An interesting observation was that the degree of postoperative wellbeing among the disabled patients was considerably better than in the controls subjected to oral surgery. The ultimate aim of dental treatment under general anesthesia in patients with special needs was to afford basic dental rehabilitation capable of avoiding oral septic foci in a single session and with improved quality outcomes for the patient (14).

Conclusions

The dental treatment of mentally disabled patients under general anesthesia, based on a MAS model, is safe and affords greater patient comfort than a conventional hospital admission, with a very low incidence of complications. It may be regarded as an adequate management strategy for such uncooperative patients that prove difficult to treat correctly. Patients with severe disorders (ASA III) may be included in this strategy. The anesthesia and surgery times are longer in mentally disabled patients because of the intraoperative management difficulties they pose, but the time to discharge after surgery is no longer than in other types of patients. Lastly, the postoperative patient condition after discharge home is seen to be better than among the controls in surgical procedures of this kind. Further studies should explore how to create a standardized protocol for performing dental treatments for disabled people under general anesthesia.

References

1. Morisaki I. Oral healthcare for the persons with special needs. *Clin Calcium*. 2017;27:1417-25.
2. Schalock RL, Luckasson R, Tassé MJ. The contemporary view of intellectual and developmental disabilities: Implications for psychologists. *Psicothema*. 2019;31:223-8.
3. Williams JJ, Spangler CC, Yusuf NK. Barriers to dental care access for patients with special needs in an affluent metropolitan community. *Spec Care Dentist*. 2015;35:190-6.
4. Frank M, Keels MA, Quiñonez R, Roberts M, Divaris K. Dental Caries Risk Varies Among Subgroups of Children with Special Health Care Needs. *Pediatr Dent*. 2019;41:378-84.
5. Waldron C, Nunn J, Mac Giolla Phdraig C, Comiskey C, Guerin S, van Harten MT, Donnelly-Swift E, Clarke MJ. Oral hygiene interventions for people with intellectual disabilities. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;5:CD012628.
6. Monteserín-Matesanz M, Esparza-Gómez GC, García-Chías B, Gasco-García C, Cerero-Lapiedra R. Descriptive study of the patients treated at the clinic "integrated dentistry for patients with special needs" at Complutense University of Madrid (2003-2012). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2015;20:e211-7.
7. Pujade C, Kheng R, Braconni M, Monnier A, Hoang L, Dursun E, et al. Dental care for disabled people. *Sante Publique*. 2017;29:677-84.
8. França K, Miranda AF, Almeida JCF, Costa PP, Garcia FCP. Prevalence of dental trauma in disabled persons seen at the dental clinic for special-needs patients of the Catholic University of Brasília (UCB). *Rev Odontol da UNESP*. 2018;47:12-7.
9. Campbell RL, Shetty NS, Shetty KS, Pope HL, Campbell JR. Pediatric Dental Surgery Under General Anesthesia: Uncooperative Children. *Anesth Prog*. 2018;65:225-30.
10. Jockusch J, Hopfenmüller W, Ettinger R, Nitschke I. Outpatient, dental care of adult vulnerable patients under general anaesthesia-a retrospective evaluation of need for treatment and dental follow-up care. *Clin Oral Investig*. 2021;25:2407-17.
11. Corcuera-Flores JR, Delgado-Muñoz JM, Ruiz-Villandiego JC, Maura-Solivellas I, Machuca-Portillo G. Dental treatment for handicapped patients; sedation vs general anesthesia and update of dental treatment in patients with different diseases. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19:e170-6.
12. Mallineni SK, Yiu CKY. Dental treatment under general anesthesia for special-needs patients: analysis of the literature. *J Investig Clin Dent*. 2016;7:325-31.
13. Cortiñas-Saenz M, Martínez-Gomez L, Roncero-Goig M, Saez-Cuesta U, Ibarra-Martin M. Results of a major ambulatory oral

surgery program using general inhalational anesthesia on disabled patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009;14:e605-11.

14. Wang YC, Lin IH, Huang CH, Fan SZ. Dental anesthesia for patients with special needs. *Acta Anaesthesiol Taiwan*. 2012;50:122-5.
15. Lee PY, Chou MY, Chen YL, Chen LP, Wang CJ, Huang WH. Comprehensive dental treatment under general anesthesia in healthy and disabled children. *Chang Gung Med*. 2009;32:636-42.
16. Tahmassebi JF, Achol LT, Fayle SA. Analysis of dental care of children receiving comprehensive care under general anaesthesia at a teaching hospital in England. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2014;15:353-60.
17. Han JH, Hyun HH, Kim YJ, Kim JW, Jang KT, Kim CC, et al. Dental treatment under general anesthesia in an intellectually disabled child with intellectually disabled parents. *J Dent Anesth Pain Med*. 2016;16:213-6.
18. Kumar MS, Kar Yung YC. A Retrospective Review of Outcomes of Dental Treatment Performed for Special Needs Patients under General Anaesthesia: 2-Year Follow-Up. *ScientificWorldJournal*. 2014;2014:748353.
19. Choi J, Doh RM. Dental treatment under general anesthesia for patients with severe disabilities. *J Dent Anesth Pain Med*. 2021;21:87-98.
20. Chen CY, Chen YW, Tsai TP, Shih WY. Oral health of children with special health care needs receiving dental treatment under general anesthesia at the dental clinic of Taipei Veterans General Hospital in Taiwan. *J Chin Med Assoc*. 2014;77:198-202.
21. Solanski N, Kumar A, Awasthi N, Kundu A, Mathur S, Bidhumadhav S. Assessment of oral status in pediatric patients with special health care needs receiving dental rehabilitation procedures under general anesthesia: a retrospective analysis. *J Contemp Dent Pract*. 2016;17:476-9.
22. Ciftci V, Yazicioglu İ. A Retrospective Comparison of Dental Treatment under General Anesthesia Provided for Uncooperative Healthy Patients and Patients with Special Health Care Needs. *J Clin Pediatr Dent*. 2020;44:196-201.
23. Chang J, Kim HY. Prognostic factors of single-visit endodontic and restorative treatment under general anesthesia for Special needs patients. *J Oral Rehabil*. 2017;44:96-104.
24. Kim IH, Kuk TS, Park SY, Choi YS, Kim HJ, Seo KS. Prognosis following dental Implant treatment under general anesthesia in patients with Special needs. *J Dent Anesth Pain Med*. 2017;17:205-13.
25. Hong YJ, Dan JB, Kim MJ, Kim HJ, Seo KS. Prognosis after treatment with multiple dental implants under general anesthesia and sedation in a cerebral palsy patient with mental retardation: A case report. *J Dent Anesth Pain Med*. 2017;17:149-55.
26. Young AS, Fischer MW, Lang NS, Cooke MR. Practice patterns of dentist Anesthesiologists in North America. *Anesth Prog*. 2018;65:9-15.
27. Pham L, Tanbonliong T, Dizon MB, Huang A, Cooke M. Trends in general anesthesia utilization by Board-Certified Pediatric Dentists. *Pediatr Dent*. 2018;40:124-30.
28. Sitalci T, Demirgan S, Akcay C, Kahraman N. Comparison of patients with and without intellectual disability under general anesthesia: A retrospective study. *Niger J Clin Pract*. 2017;20:438-44.
29. Conner ER, Musser ED, Colpitts KM, Laochamroonvorapongse DL, Koh JL. Perioperative opioid administration in children with and without developmental delay undergoing outpatient dental Surgery. *J Clin Anesth*. 2017;37:92-6.
30. Escanilla-Casal A, Aznar-Gómez M, Viaño JM, López-Giménez A, Rivera-Baró A. Dental treatment under general anesthesia in a group of patients with cerebral palsy and a group of healthy pediatric patients. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2014;19:490-4.

Acknowledgements

This study was supported by grant, CFMA is a recipient of a predoctoral fellowship from Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU18/00854).

Conflicts of interest

The authors declare no potential conflict of interest and no sources of funding regarding the authorship and/or publication of this article.

Journal section: Community and Preventive Dentistry
Publication Types: Research

doi:10.4317/jced.56411
https://doi.org/10.4317/jced.56411

Oral health knowledge in relation to educational level in an adult population in Spain

Cecilia-Fabiana Márquez-Arrico ¹, Jose-Manuel Almerich-Silla ², Jose-Maria Montiel-Company ²

¹ Master degree, DDS, pre-doctoral research. Department of Stomatology, University of Valencia, Spain

² Lecturer Professor. Department of Stomatology, University of Valencia, Spain

Correspondence:
Clínica Odontológica
Universitat de València
C/Gascó Oliag 1
Valencia (46010), Spain
dra.cecilia.marquez@gmail.com

Received: 08/10/2019
Accepted: 04/11/2019

Márquez-Arrico CF, Almerich-Silla JM, Montiel-Company JM. Oral health knowledge in relation to educational level in an adult population in Spain. J Clin Exp Dent. 2019;11(12):e1143-50.
<http://www.medicinaoral.com/odo/volumenes/v11i12/jcedv11i12p1143.pdf>

Article Number: 56411 <http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm>
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
eMail: jced@jced.es
Indexed in:
Pubmed
Pubmed Central® (PMC)
Scopus
DOI® System

Abstract

Background: To analyze the relationship between oral health knowledge and educational level among an adult population in Spain, and between oral health knowledge and subjects' oral hygiene practices, dietary habits, toxic habits, and oral quality of life.

Material and Methods: This transversal study used the Comprehensive Measure of Oral Health Knowledge (CMO-HK) questionnaire to evaluate subjects' knowledge and understanding of oral health, and the World Health Organization oral health questionnaire for adults to evaluate dietary, oral hygiene, toxic habits, and oral quality of life. Participants (n=400) gave their informed consent and data release permission before taking part in the study, which was approved by the University of Valencia Ethics Committee (certificate No.: H145160675341). Statistical analysis was performed using SPSS v22.0 software, applying Student's t-test, ANOVA, and chi2 test, with significance set at $p < 0.05$.

Results: Oral health knowledge results were: low 41.5% and high 58.5%. An association was found between educational level and oral health knowledge (Chi2: $p=0.000$). Oral hygiene habits presenting an association with higher levels of oral health knowledge were dental floss use, a higher number of teeth present, and lower prevalence of partial prostheses. A significant association was found between oral quality of life and oral health knowledge.

Conclusions: Oral health knowledge is associated with the individual subject's educational level. But oral health knowledge is not necessarily reflected in the practice of healthy habits.

Key words: Oral health literacy, oral health habits, oral health knowledge, CMOHK.

Introduction

Oral health education is a fundamental tool for the prevention of most bucodental diseases. This aims to induce subjects to adopt and maintain healthy habits, make use

of the healthcare services available and to make decisions, both individually and collectively, to improve both their oral health and circumstantial factors affecting oral health. Over the last ten years, a number of researchers

have developed tools for measuring knowledge and understanding of oral health issues and practices among adults, as awareness is the first step towards a healthy lifestyle. The tools available for measuring oral health knowledge are based on assessments of understanding, knowledge, identification or a combination of these, by means of short questions and/or multiple choice questions about oral health and buccodental hygiene practices (1). Using oral hygiene questionnaires helps to assess the efficacy of healthcare interventions, dental caries prevention campaigns, or anti-smoking campaigns, among others. Although there are many questions concerning oral health habits, the use of a standardized method such as the World Health Organization (WHO) questionnaire, will help to compare and contrast the results and obtain homogeneous data for planning healthcare programs (2).

One of the most widely used questionnaires for measuring oral health literacy in adults is the REALD questionnaire “Rapid Estimate of Adult Literacy in Dentistry” (3). The first version of this questionnaire was created by Richman *et al.* in 2007, based on REALM, a questionnaire created for assessing general medical literacy. The REALD-99 consisted of 99 items with a simple point-scoring method; patients are asked to read lists of oral health terms, awarding one point for every word read and pronounced correctly, obtaining a maximum score of 99 points. This instrument made it possible to compare the scores obtained and analyze their associations with other socio-demographic variables such as age, sex, educational levels, and other variables recorded in the questionnaire. As this is a lengthy questionnaire, it was decided to create a shorter version, without compromising the validity of the original, which led to the REALD-30, launched in 2007 by Lee *et al.* (3). The REALD and the REALM are valid tools for evaluating oral health literacy, but they do not assess subjects’ real understanding of oral healthcare. Subjects are often familiar with a term, and can pronounce it correctly, but it remains unclear whether he/she really understands its meaning. So, to fill this gap, the ToFHLiD6 (functional understanding of oral health terminology and numerical capability) Test of Functional Health Literacy in Dentistry was developed in 2007 (4). This tool assesses the subject’s understanding and numerical capability, and was the first tool available for evaluating real understanding of oral health matters (1). In 2010, Macek *et al.* created a questionnaire that combined the REALM (oral health literacy) and the ToFHLiD. This tool was named the Comprehensive Measure of Oral Health Knowledge (CMOHK) (5) and was validated by the University of Maryland (USA). The advantage of the questionnaire is that as well as measuring whether a subject is capable of understanding concepts relating to oral health, it also determines whether he/she possesses basic knowledge of different dental pathologies.

It is known that a person’s behavior in terms of daily oral hygiene, nutrition, and toxic habits (such as smoking and drinking alcohol) does not depend on awareness and understanding of oral health issues but is subject to much more complex processes. In addition to knowledge and awareness, for an individual to acquire good oral hygiene habits, he/she must be motivated to adopt good habits, supported by circumstances and resources that make it possible to carry out these practices, among other factors (6). This means that although a subject may have good knowledge and understanding of oral healthcare, this is not necessarily reflected in his/her everyday oral health habits.

At the same time, it is useful to obtain information about the socio-economic levels within a study population, as this is usually an influential variable in the prevalence of buccodental pathology. In 2015, an epidemiological study of oral health in Spain found that dental caries and periodontal disease (among other buccodental characteristics and pathologies recorded in the study) were more prevalent at lower socio-economic levels in both children and adults (7). Transversal studies are able to identify those groups more susceptible to buccodental disease as well as those who have not received sufficient health education. The main objective of this study was to analyze the relationship between oral health knowledge according to the CMOHK questionnaire, and educational levels, oral hygiene habits, age, and sex in an adult population. It also analyzed the relationship between levels of oral health knowledge and oral quality of life.

Material and Methods

This transversal study took the form of a survey based on questionnaires, one evaluating oral health knowledge, and another oral hygiene habits, among a population of adult (aged over 18 years) male and female Spanish dental patients and the individuals accompanying them. The survey was conducted at the Dental Clinic at the University of Valencia. Field work was carried out between September 2017 and June 2018 (n=400).

The questionnaires were completed in the waiting rooms at the University of Valencia Dental Clinic, and were filled out by both patients and individuals accompanying them. Each subject was provided with full information about the study objectives and gave their informed consent to take part and data release permission. The study protocol was approved by the University of Valencia Ethics Committee (Certificate no. H145160675341). When the informed consent form had been signed, the subject was given two questionnaires (one to evaluate oral health knowledge and another to assess oral hygiene habits and other variables). When completed, both questionnaires were returned to the surveyor who remained present throughout the process to answer any questions. Each participant was allotted an identification number.

Thereafter each participant remained anonymous, as did all personal data such as age, sex, profession, and educational level.

-Questionnaires

The CMOHK questionnaire was used to evaluate subjects' oral health knowledge (5). This consists of 26 multiple-choice questions with only one correct answer. Questions 1-3 evaluate dental variables, which do not contribute to the oral health knowledge results, but provide other information for further analysis. The CMOHK awards a point for each question answered correctly, making a total maximum score of 23 points, sub-divided into domains corresponding to areas of buccodental knowledge and understanding. The CMOHK questions are grouped as six domains: 1. General dental knowledge (questions 4, 6, 25, and 26); 2. Knowledge about children's oral health, disease and prevention (questions 5, 7, 13, and 21). 3. Knowledge of oral disease prevention (questions 9, 11, 12, and 16); 4. Knowledge of dental treatments (questions 8, 10, 17, 18, and 20); 5. Knowledge of periodontal disease (questions 19, 22, 23, and 24); 6. Knowledge of oral cancer (questions 14 and 15). Following the method described by Patiño *et al.* in 2015, two levels of knowledge were determined: low level of knowledge (0-14 points), high level of knowledge (15-23 points).

The WHO oral health survey fifth edition (2013) was used to evaluate oral health habits, which also records age, sex, educational level (question 16) as demographic and socio-economic variables. The questionnaire records the number of teeth present, the presence/absence of removable prostheses, and how subjects view their own oral health. Subjects are asked about their oral hygiene practices including the frequency of tooth brushing, use of dental floss, mouthwashes, interspace brushes, etc. Questions 10 and 11 record the frequency of visits to the dentist and the reasons for them. The survey has a section that records 12 oral quality of life items (question 12), and nine items concerning the consumption of sugary foods and drinks (question 12), and toxic habits (alcohol consumption and smoking) (Questions 14 and 15).

To calculate odds ratios (OR) of significant variables, it was necessary to dichotomize oral quality of life variables as two categories. Category 1 grouped responses related to discomfort reported to be very frequent or fairly frequent, while the category 0 grouped responses that reported no discomfort during the last 12 months. To assess the relationship between levels of oral health knowledge and educational level, educational levels were categorized as one of three groups (low, medium or high). A low educational level consisted of subjects who had not received any formal schooling or had not completed primary education; medium included subjects who had completed secondary education or had

undergone vocational training; a high level comprised subjects who had completed higher education to degree or post-graduate level.

-Sample size calculation

It was calculated that a random sample of 389 individuals would be sufficient to estimate, with a 95% confidence interval (CI) and +/- 0.45 units precision, a population mean obtained by the CMOHK of 15.2 points, which was predicted to show a standard deviation of around 4 units. The replacement percentage necessary was predicted to be 20%. To make this calculation, data were used from a pilot study using the same methods applied to a similar population of 171 subjects.

-Statistical analysis

Statistical analysis was performed with SPSS 22.0. Software. For quantitative variables, means and confidence intervals were calculated, while proportions were calculated for categorical variables. Student's T-test and analysis of variance (ANOVA) were used to compare means. The Chi2 test was used to compare proportions. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Logistic regression was performed using the forward conditional method with low oral health knowledge as dependent variable and age and educational level as predictive variables.

Results

-Descriptive results

A total of 439 participants handed in questionnaires, of whom 412 had completed them (a response rate of 93.84%). Twelve subjects were discarded, eight because various options had been marked in multiple choice questions, two because only one of the two questionnaires had been completed, and two because the subjects could not read Spanish. Therefore, a total of 400 subjects were included in analysis. Of the 400 participants, 237 were women (59.3%) and 163 men (40.8%). The mean age of the sample was 45.2 ± 13.7 years. Regarding age groups, 144 participants were aged between 18 and 40 years (36.4%), 172 between 41 and 55 years (43%) and lastly 83 subjects were aged over 55 years (20.8%). Subjects' educational level was low in 20.0% cases, medium in 38.3%, and high in 41.8%. The mean score obtained in the questionnaire was 14.7 points (IC-95% between 14.3 and 15.1). The scores obtained were classified as two levels of oral health knowledge: low level (<14 points) 41.5% (n=116) and high level (>14 points) 58.5% (n=234).

-CMOHK questionnaire results

The mean score obtained in the CMOHK was significantly higher among young subjects (18-40 years). As age increased the mean score obtained, both in the total score and subdivided scores allotted to the questionnaire's different domains decreased significantly. When the results were analyzed according to sex, women

achieved a significantly higher mean score than men, a pattern repeated in the domains “Children’s oral health, disease and prevention” and “Periodontal Disease.” Educational level also showed a relationship with mean CMOHK scores. Subjects with a high educational level (subjects who had completed higher education to degree or post-graduate level) obtained a significantly higher mean score both in overall scores and in individual domains, compared with subjects with medium and low educational levels (Table 1).

When the results were analyzed in terms of oral health knowledge levels, it was seen that subjects who had reached higher educational levels had significantly higher levels of oral health knowledge than subjects with medium or low educational levels. A linear tendency could be observed between the categories ($p=0.000$) whereby as educational level increased, so did the percentage of individuals with a high level of oral health knowledge. The same tendency was observed with the age variable, so that younger subjects (18-40 years) obtained significantly higher average oral health knowledge scores (Table 2).

A low educational level was found to be a predictive fac-

tor for a low level of oral health knowledge, compared with subjects with medium or high educational levels (OR 1.929). Age was also found to be a predictive factor of a low oral health knowledge level. Older subjects were shown to show almost 2% greater risk of having a low level of oral health knowledge (OR 1.015) (Table 3). -Association between habits and oral health knowledge Oral hygiene habits that showed an association with a higher level of oral health knowledge were: use of dental floss (49.1% of subjects with a high level of oral health knowledge used dental floss in comparison with 28.9% of subjects with a low level of knowledge [$p=0.000$]); higher number of teeth present (82.9% of subjects with a high level of knowledge also presented 20 or more natural teeth compared with 67.9% of subjects with a low level of knowledge [$p=0.004$]); and lower incidence of removable partial prostheses (22.3% of subjects with a low level of oral health knowledge had a removable partial prosthesis compared with 12.4% among subjects with a high level [$p=0.009$]). Frequency of tooth brushing, the use of mouthwashes and inter-space brushes did not present significant associations with levels of oral health knowledge.

Table 1: Mean CMOHK scores by domain, in relation to age, sex, and educational level.

Domains	Age	Mean (IC95%)	ANOVA test p value	Sex	Mean (IC95%)	Student-test p-value	Level of education	Mean (IC95%)	ANOVA test p value
General dental knowledge	18-40 years	2.6(2.5-2.8)	0.010*	F	2.4(2.3-2.5)	0.813	Low	2(1.8-2.3)	0.001*
	41-55 years	2.4(2.3-2.6)			2.4(2.3-2.6)		Middle	2.5(2.3-2.6)	
	>55 years	2.2(1.9-2.4)		M			High	2.6(2.4-2.8)	
Children’s oral health, disease and prevention	18-40 years	2.3(2.1-2.5)	0.007*	F	2.4(2.2-2.5)	0.000**	Low	1.7(1.4-1.9)	0.000**
	41-55 years	2.3(2.1-2.5)			1.9(1.7-2.1)		Middle	2.1(1.9-2.3)	
	>55 years	1.9(1.6-2.1)		M			High	2.5(2.3-2.6)	
Oral disease prevention	18-40 years	2.7(2.5-2.8)	0.095	F	2.6(2.5-2.7)	0.108	Low	2.3(2.1-2.5)	0.000**
	41-55 years	2.6(2.5-2.8)			2.4(2.3-2.6)		Middle	2.4(2.3-2.6)	
	>55 years	2.4(2.2-2.6)		M			High	2.8(2.6-2.9)	
Knowledge pertaining to dental treatment	18-40 years	4.2(4.1-4.3)	0.184	F	4.2(4.1-4.3)	0.131	Low	3.9(3.6-4.1)	0.01*
	41-55 years	4.2(4.1-4.4)			4(3.9-4.2)		Middle	4.1(3.9-4.2)	
	>55 years	4(3.7-4.3)		M			High	4.3(4.2-4.8)	
Periodontal disease	18-40 years	2.4(2.2-2.6)	0.013*	F	2.4(2.2-2.5)	0.040*	Low	1.8(1.5-2.1)	0.000**
	41-55 years	2.4(2.3-2.6)			2.1(1.9-2.3)		Middle	2.2(2.1-2.4)	
	>55 years	2(1.7-2.3)		M			High	2.6(2.4-2.7)	
Knowledge pertaining to oral cancer	18-40 years	1.1(1-1.2)	0.035*	F	0.9(0.8-1)	0.307	Low	0.7(0.5-0.9)	0.000**
	41-55 years	0.9(0.8-1)			0.9(0.8-1)		Middle	0.9(0.7-1)	
	>55 years	0.8(0.7-1)		M			High	1.1(1-1.2)	
Total	18-40 years	15.3(14.7-15.9)	0.001*	F	15.1(14.6-15.6)	0.010*	Low	12.6(11.5-13.6)	0.000**
	41-55 years	15(14.4-15.6)			14.1(13.4-14.7)		Middle	14.4(13.8-15)	
	>55 years	13.2(12.2-14.3)		M			High	16(15.2-16.5)	

* $p<0.05$; ** $p<0.001$; F= Female; M= Male

Table 2: Association between oral health knowledge according to CMOHK and variables age, sex, educational level.

Oral Health Knowledge Score	Age	N (%)	Chi ² p-value	Sex	N (%)	Chi ² p value	Level of education	N (%)	Chi ² p-value
Low level (0-14)	18-40 years	55(38.2)	0.014*	F	99(41.8)	0.894	Low	49(61.3)	0.000*
	41-55 years	64(37.2)					Middle	69(45.1)	
	>55 years	46(54.5)		M	67(41.1)		High	48(28.7)	
High level (15-23)	18-40 years	89(61.8)		F	138(58.2)		Low	31(38.8)	
	41-55 years	108(62.8)					Middle	84(54.9)	
	>55 years	37(44.6)		M	96(58.9)		High	119(71.3)	

*p<0.05; **p<0.001; F= Female; M= Male

Table 3: Logistic regression model, with forward conditional method.

	Low level of oral health knowledge according to CMHOHK			
	B	SD	p	OR (IC 95%)
Age	0.015	0.008	0.056	1.015 (1.000-1.031)
High level education (Category reference)	-	-	-	-
Medium level education	1.214	0.297	0.000**	3.367 (1.882-6.024)
Low level education	0.657	0.238	0.000**	1.929 (1.209-3.077)

**p<0.001

Smoking and alcohol consumption did not present significant associations with levels of oral health knowledge. Nor was any significant association found between the consumption of sugary foods and drinks and oral health knowledge.

-Oral quality of life results in relation to CMHOK oral health knowledge levels

The overall oral quality of life variable was calculated by totaling each of the sections in Question 12 of the WHO oral health questionnaire. According to this instrument, the higher the score obtained, the higher the subject's level of oral quality of life affectation. To determine the relationship between oral quality of life and oral health knowledge level, Student's T-test was applied comparing the mean quality of life score obtained by subjects with high and low levels of oral health knowledge. Subjects with low knowledge levels reported "Difficulty in biting foods," "Difficulty with speech/trouble pronouncing words," "Felt tense because of problems with teeth or mouth," "Have avoided smiling because of teeth," "Have taken days off work," and/or "difficulty doing usual activities" (during the previous 12 months) with significantly greater frequency than subjects with high levels of oral health knowledge (Table 4).

Discussion

The results obtained in the present study concur with those obtained in other research analyzing the relations-

hip between oral health knowledge levels and educational levels. The mean score obtained using the CMOKH was very similar to the score obtained by Patiño in 2015 (around 14 points). Macek *et al.* (2010) and Naghibi *et al.* (2014) (8) found that the domain with the lowest scores was knowledge of oral cancer, while the highest score was for knowledge of dental treatments.

The incidence of cancer of the lips and oral cavity varies according to geographical area and population. Globally, oral cancers represent 3.8% of all cancers. Worldwide, it is estimated that there are 529.500 new cases of oral cancer annually, leading to 292.300 deaths. Cancer of the lip, mouth and throat occupies fourteenth place among all tumors. In Spain, 4,980 new cases of lip, mouth or throat cancer are recorded among men annually, and 1,690 new cases among women (per 100,000 persons per year). Every year, 1,500 Spaniards lose their lives to oral cancer but only 20-30% of oral cancers are diagnosed at early stages (9). Oral cancer is clearly a topic of great relevance and yet unawareness of this oral health issue persists among the general population.

Regarding levels of oral health knowledge in relation to sex, more women were found to present higher levels of knowledge than men. This agrees with other authors (5,10,11) who found that women obtained significantly higher scores in results grouped according to domain. The study by (12) also found that women obtained better

Table 4: Results of WHO oral quality of life questionnaire. The chi-squared test was applied to analyze association between CMOHK oral health knowledge level and oral quality of life.

Because of the state or your teeth or mouth, ¿How often have you experienced any of this following problems?	Answer	N (%)	Chi squared p-value
12.1) Difficulty in biting foods	Very often	23(5.8)	p= 0.001*
	Fairly often	23 (5.8)	
	Sometimes	69 (17.3)	
	No	263 (65.8)	
	Don't know	20 (5.0)	
12.2) Difficulty chewing foods	Very often	24(6.0)	p= 0.054
	Fairly often	19 (4.8)	
	Sometimes	68 (17.0)	
	No	278 (69.5)	
	Don't know	11(2.8)	
12.3) Difficulty with speech/trouble pronouncing words.	Very often	5 (1.3)	p= 0.012*
	Fairly often	9 (2.3)	
	Sometimes	24(6.0)	
	No	341 (85.3)	
	Don't know	19 (4.8)	
12.4) Dry mouth	Very often	10 (2.5))	p=0.211
	Fairly often	13 (3.3)	
	Sometimes	72 (18.0)	
	No	285 (71.3)	
	Don't know	19 (4.8)	
12.5) Felt embarrassed due to appearance of teeth	Very often	20 (5.0)	p= 0.137
	Fairly often	31 (7.8)	
	Sometimes	70 (17.5)	
	No	261 (65.3)	
	Don't know	16 (4.0)	
12.6) Felt tense because of problems with teeth or mouth	Very often	10 (2.5)	p= 0.030*
	Fairly often	19 (4.8)	
	Sometimes	54 (13.5)	
	No	291 (72.8)	
	Don't know	19 (4.8)	
12.7) Have avoided smiling because of teeth	Very often	21 (5.3)	p= 0.005*
	Fairly often	14 (3.5)	
	Sometimes	45 (11.3)	
	No	303 (75.8)	
	Don't know	16 (4.0)	
12.8) Had sleep that is often interrupted	Very often	14 (3.5)	p= 0.412
	Fairly often	11 (2.8)	
	Sometimes	36 (9.0)	
	No	319 (79.8)	
	Don't know	20 (5.0)	
12.9) Have taken days off work	Very often	0 (0)	p= 0,044*
	Fairly often	0 (0)	
	Sometimes	5 (1.3)	
	No	373 (93.3)	
	Don't know	17 (4.3)	

Table 4 continue: Results of WHO oral quality of life questionnaire. The chi-squared test was applied to analyze association between CMOHK oral health knowledge level and oral quality of life.

12.10) Difficulty doing usual activities	Very often	4 (1.0)	<i>p</i> = 0.046*
	Fairly often	3 (0.8)	
	Sometimes	13 (3.3)	
	No	361 (90.3)	
	Don't know	18 (4.5)	
12.11) Felt less tolerant of spouse or people who are close to you	Very often	0 (0.0)	<i>p</i> = 0.216
	Fairly often	4 (1.0)	
	Sometimes	15 (3.8)	
	No	360 (90.0)	
	Don't know	21 (5.3)	
12.12) Have reduced participation in social activities	Very often	3 (0.8)	<i>p</i> = 0.191
	Fairly often	7 (1.8)	
	Sometimes	11 (2.8)	
	No	358 (89.5)	
	Don't know	19 (4.8)	

* *p* < 0.05.

results than men although without statistically significant difference.

Investigating educational levels in relation to levels of oral health knowledge, it was observed that as subjects' educational level increased, so did their level of oral health knowledge, with a linear tendency among the categories. These results coincide with those obtained in other studies, so that subjects who have not entered higher education obtained lower overall scores both in total scores and in scores for individual knowledge domains (10,12-15).

Comparing the present results with data obtained in other countries and other populations, the association between a subject's oral health knowledge and age, sex and educational level is consistent (12,13,16-18). A study conducted in China in 2019 with a sample of 263 middle-aged subjects found a significant relation between age, low educational level, and low oral health knowledge. Socioeconomic level also influenced oral health knowledge, whereby subjects with less purchasing power showed lower levels of oral health knowledge. Poor oral health knowledge was also associated with deficient oral hygiene and higher numbers of lost teeth. These results show how training in oral health is reflected in a subject's capacity to maintain oral hygiene and in the consequences, for example, retaining more healthy teeth (16). In agreement with the present study, it has also been shown how subjects who have completed higher education tend to adopt specific oral hygiene practices such as dental flossing (7,12,16,18). A study of 360 middle-aged Slovak subjects found a significant association between higher education and dental floss use. At the same time, women who had completed higher education showed better oral hygiene habits than men.

Low socioeconomic level was found to be a risk factor for poor oral health knowledge and deficient oral hygiene habits (13). A similar relationship between socioeconomic level, oral hygiene habits and educational level was also found among a population in south-east Iran (17); this study with a sample of 264 adults, analyzed oral hygiene habits and levels of oral health knowledge. It was found that subjects who did not reach medium or higher educational levels were not well informed or trained in correct oral hygiene maintenance, and were not aware of the importance of regular dental check-ups. It was also observed that women presented higher levels of oral health knowledge than men (17,19).

In light of the above, the data obtained in different studies conducted among different populations in different countries show great consistency in the association between educational level, oral health knowledge, and certain oral health habits. Oral health education programs aimed at groups with lower educational levels may prove useful to bring about a general improvement in oral health.

It is known that quality of life is generally related to socioeconomic level, as purchasing power facilitates access to goods and services, including oral healthcare. A low socio-economic level has been seen to affect oral quality of life (20). In the present study, it was seen how a low level of oral health knowledge did not condition poor oral quality of life, but did influence factors such as pain/discomfort when chewing food, as well as problems in speaking and pronunciation, these being related to early dental loss and the presence of removable partial prostheses, variables that were significantly more frequent among subjects with low levels of oral health knowledge.

The present study's main limitation was that its transversal design was unable to signify causality. In addition, the sample selection was not random as most of the patients and their companions/family members were attending a dental clinic, a fact that may have compromised the representativity of the sample. Nevertheless, the sample size was adequate and achieved a high response rate (93.8%). Self-completed questionnaires avoided any excessive influence of an interviewer, who was only present to clear up any queries about how to complete the questionnaire correctly.

Conclusions

As a general conclusion it may be stated that there is an association between the educational level of the adult population studied and levels of oral health knowledge; as the educational level of the subjects increased so did their oral health knowledge. Subjects aged over 55 years presented a lower level of oral health knowledge; as age increased mean scores for oral health knowledge decreased. Women showed a higher level of oral health knowledge than men, particularly in the domains children's oral health, disease and prevention, and periodontal disease. An association exists between oral quality of life and level of oral health knowledge. Subjects reporting difficulty chewing food, problems with speaking and pronunciation, felt concerned with the state of their teeth, avoided smiling, took time off work or experienced difficulty carry out everyday tasks because of dental discomfort, also showed a significant association with a low level of oral health knowledge.

References

- Dickson-Swift V, Kenny A, Farmer J, Gussy M, Larkins S. Measuring oral health literacy: a scoping review of existing tools. *BMC Oral Health*. 2014;14:148.
- WHO. WHO | Oral health surveys: basic methods - 5th edition. WHO. 2013.
- Lee JY, Rozier RG, Lee SYD, Bender D, Ruiz RE. Development of a word recognition instrument to test health literacy in dentistry: the REALD-30--a brief communication. *J Public Health Dent*. 2007;67:94-8.
- Gong DA, Lee JY, Rozier RG, Pahel BT, Richman JA, Vann WF. Development and testing of the Test of Functional Health Literacy in Dentistry (TOFHLiD). *J Public Health Dent*. 2007;67:105-12.
- Macek MD, Haynes D, Wells W, Bauer-Leffler S, Cotten PA, Parker RM. Measuring conceptual health knowledge in the context of oral health literacy: preliminary results. *J Public Health Dent*. 2010;70:197-204.
- McEachan RRC, Conner M, Taylor NJ, Lawton RJ. Prospective prediction of health-related behaviours with the Theory of Planned Behaviour: a meta-analysis. *Health Psychol Rev*. 2011;5:97-144.
- Pérez BM, Silla AJ, Márquez A V, Gutiérrez AP, González BJ, Díaz CE, et al. Encuesta de Salud Oral en España 2015. Vol. 21, RCOE. 2016.
- Naghbi Sistani MM, Montazeri A, Yazdani R, Murtomaa H. New oral health literacy instrument for public health: development and pilot testing. *J Investig Clin Dent*. 2014;5:313-21.
- Galceran J, Ameijide A, Carulla M, Mateos A, Quirós JR, Rojas D, et al. Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol*. 2017;19:799-825.
- Macek MD, Atchison KA, Chen H, Wells W, Haynes D, Parker RM, et al. Oral health conceptual knowledge and its relationships with oral health outcomes: Findings from a Multi-site Health Literacy Study. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2017;45:323-9.
- Patino D. Oral health knowledge and dental utilization among Hispanic adults in Iowa. 2015.
- Batista MJ, Lawrence HP, Sousa MDLR. Oral health literacy and oral health outcomes in an adult population in Brazil. *BMC Public Health*. 2018;18:60.
- Cepova E, Ciovakova M, Kolarcik P, Markovska N, Geckova AM. Associations of multidimensional health literacy with reported oral health promoting behaviour among Slovak adults: a cross-sectional study. *BMC Oral Health*. 2018;18:44.
- Atchison KA, Macek MD, Markovic D. The value of a combined word recognition and knowledge measure to understand characteristics of our patients' oral health literacy. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2017;45:380-8.
- McQuistan MR, Qasim A, Shao C, Straub-Morarend CL, Macek MD. Oral health knowledge among elderly patients. *J Am Dent Assoc*. 2015;146:17-26.
- Ho MH, Liu MF, Chang CC. [A Preliminary Study on the Oral Health Literacy and Related Factors of Community Mid-Aged and Older Adults]. *Hu Li Za Zhi*. 2019;66:38-47.
- Mohammadi TM, Malekmohammadi M, Hajizamani HR, Mahani SA. Oral health literacy and its determinants among adults in Southeast Iran. *Eur J Dent*. 2018;12:439-42.
- Jones M, Lee JY, Rozier RG. Oral health literacy among adult patients seeking dental care. *J Am Dent Assoc*. 2007;138:1199-208; quiz 1266-7.
- Sistani MMN, Yazdani R, Virtanen J, Pakdaman A, Murtomaa H. Oral health literacy and information sources among adults in Tehran, Iran. *Community Dent Health*. 2013;30:178-82.
- Bellamy Ortiz C.I MAA. The relationship between oral health-related to quality of life, tooth loss and removable prostheses in IMSS beneficiaries adults over the age of 50. *Av Odontostomatol*. 2014;30:195-203.

Acknowledgments

The authors received financial support from the "Ministry of Education for obtaining the Collaboration Scholarship in University Departments" for the 2017-2018 academic year.

Conflict of interest

None declared.



COVID-19 and Periodontitis: A Dangerous Association?

Francisco Javier Silvestre^{1,2*} and Cecilia Fabiana Márquez-Arrico^{2*}

¹Department of Stomatology, University of Valencia, Valencia, Spain, ²Department of Stomatology, University Hospital Doctor Peset-FISABIO, Valencia, Spain

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, periodontal disease, periodontitis, periodontal infection

The COVID-19 pandemic has presented a great challenge to society, especially in the field of healthcare. An important objective was to be able to discover the new coronavirus (SARS-CoV-2) and to know the evolution and repercussions of the disease (COVID-19), as well as to identify the factors that can alter the course and form of the disease. The development in a short time of new vaccines that favor fewer severe cases and fewer hospital admissions was also a critical need.

In December 2019, several cases of acquired pneumonia were described in a group of patients in Wuhan (Hubei, China). Since then, more than 230 million people have been infected in the world and 4 million have died (World Health Organization, 2021).

COVID-19 usually occurs in a mild or asymptomatic form, but the most serious clinical form occurs in older patients and those with certain comorbidities or an acute respiratory condition that can cause respiratory distress. In these severe forms, a systemic hyperinflammatory response can occur with an exaggerated release of cytokines, which can progress to sepsis, septic shock, multi-organ failure, and death. Adults over 65 years of age have accounted for 80% of hospitalized patients, with a higher risk of complications than in younger patients. In addition, it has been associated with certain chronic diseases such as hypertension, diabetes, obesity, cardiovascular diseases, and other diseases with poor immune function such as cancer (Larvin et al., 2020; Aquino-Martinez and Hernández-Vigueras, 2021).

On the other hand, periodontitis also increases with age, is highly prevalent, and has also been related to chronic systemic diseases such as those of a cardiovascular nature, diabetes mellitus, or obesity.

Therefore, the hypothesis of the possible association between COVID-19 and periodontitis was considered. Recently, an increased risk of complications in the evolution of SARS-CoV-2 infection has been observed in patients with previous periodontitis (Borges et al., 2020; Gupta and Sahni, 2020; Larvin et al., 2020; Aquino-Martinez and Hernández-Vigueras, 2021; Campisi et al., 2021; Marouf et al., 2021).

Moreover, in the oral cavity, the epithelial cells of the oral mucosa show a high level of expression of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptors, as well as in the fibroblasts of the periodontal ligament, and these receptors are the main entry point of the virus into the host cells. So it has been speculated that it could be a route of colonization and infection in the body. Coexpression of ACE2 receptors and the transmembrane protease enzyme SS2 (TMPRSS2), which allow the virus to enter the host cells, has been observed in these patients. TMPRSS2 and furin can cleave furin protein S of the virus. This protein also binds to CD147 to infect host cells such as the epithelial cells of the oral mucosa and gingiva. A high expression of CD147 has been observed in the gingiva and oral mucosa. The presence of SARS-CoV-2 ARS has recently been demonstrated in the crevicular fluid (GFC) (Gupta and Sahni, 2020).

In addition, periodontitis can cause changes in the structure of the periodontium due to the inflammation maintained over time in the periodontal ligament, the increase in metalloproteases that destroy the dental support tissue, and the increase in inflammatory cytokines; interleukins (ILs) 1 β , 4, 6, 7, and 17; tumor necrosis factor alpha (TNF- α); and C-reactive protein (CRP). Blood

OPEN ACCESS

Edited by:

Roberto Paganelli,
University of Studies G. d'Annunzio
Chieti and Pescara, Italy

Reviewed by:

Francesca Diomedè,
University of Studies G. d'Annunzio
Chieti and Pescara, Italy

*Correspondence:

Francisco Javier Silvestre
francisco.silvestre@uv.es
Cecilia Fabiana Márquez-Arrico
cecilia.fabiana.m@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Translational Pharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

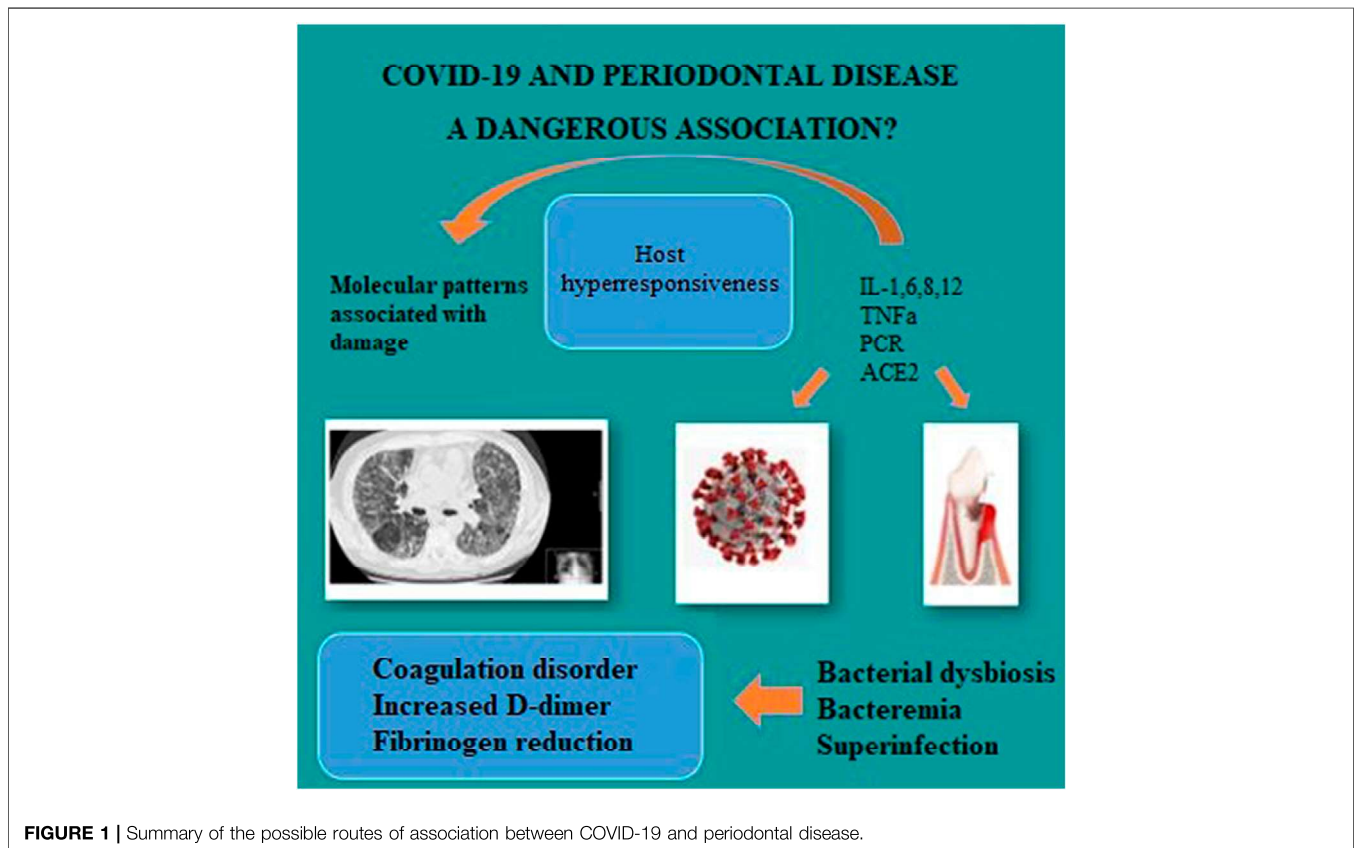
Received: 22 October 2021

Accepted: 14 December 2021

Published: 13 January 2022

Citation:

Silvestre FJ and Márquez-Arrico CF
(2022) COVID-19 and Periodontitis: A
Dangerous Association?
Front. Pharmacol. 12:789681.
doi: 10.3389/fphar.2021.789681



parameters relevant to the course of COVID-19 such as concentrations of D-dimer, HbA1c, D vitamin, white blood cells, and lymphocytes have been found to be elevated in patients with moderate-advanced periodontitis (Marouf et al., 2021). In this way, patients with previous periodontitis could be more susceptible to exacerbations of COVID-19 (Marouf et al., 2021) (**Figure 1**).

Interestingly, an increase in cytokines in blood samples from patients with moderate or severe COVID-19 has been observed, and this increase in cytokines may be related to a worsening in the evolution of the disease (Marouf et al., 2021). An increase in blood cytokines has also been detected in patients with chronic periodontitis, and it has been proven that periodontal treatment favors serum reduction of the cytokine levels (Marouf et al., 2021).

Periodontal inflammation against the background of periodontitis has an overexpression of IL-6 and IL-17. IL-6 is also overexpressed alongside IL-1 when SARS-CoV-2 infects the airway. Over the course of COVID-19, the lethality of interstitial pneumonia has been linked to overproduction of IL-6 and other ILs. Therefore, there could be a link between the low-grade inflammation of advanced periodontitis and the aggravation of COVID-19 in the context of other chronic diseases (diabetes and obesity) (Campisi et al., 2021). Another mechanism of periodontitis is the so-called extracellular neutrophil entrapment (NETs), which represents an alternative form of cell death and tissue damage through immune mechanisms

(Magán-Fernández et al., 2019; Borges et al., 2020; Gupta and Sahni, 2020; Magán-Fernández et al., 2020). Cell death by NETs can also be stimulated by SARS-CoV-2 (Gupta and Sahni, 2020). Exacerbation of NET production has been observed in advanced stages of COVID-19 and periodontitis, which could hypothesize a certain relationship between the physiopathogenic mechanisms of immune hyperresponse in both diseases (Magán-Fernández et al., 2019; Borges et al., 2020; Gupta and Sahni, 2020; Magán-Fernández et al., 2020). However, the mechanisms that comprise this association are yet to be determined.

Studies have recently been published where periodontitis has been linked to an increased risk of complications from COVID-19 (Magán-Fernández et al., 2019; Borges et al., 2020; Gupta and Sahni, 2020; Magán-Fernández et al., 2020; Takahashi et al., 2020; Anand et al., 2021; Campisi et al., 2021; Gupta et al., 2021; Larvin et al., 2021).

It has been speculated that the possible dissemination of periodontopathogenic bacteria inside the lower respiratory tract creates favorable conditions for suffering from the most severe SARS-CoV-2 infection through tissue damage and accelerating the process of cellular senescence at this level, as well as facilitating lung infection. Also, periodontal bacteria could be introduced through endotracheal intubation to which patients with respiratory distress are subjected (Aquino-Martinez and Hernández-Vigueras, 2021).

Besides, hospitalization of patients with periodontitis generates a situation of worsening of their oral health for the

following reasons: the lack of oral hygiene in the hospitalized patients generating an increase in bacterial plaque due to the lack of good chemical–mechanical control, intubation of the patients and consequent parenteral feeding, general lack of stimulation of the salivary glands, dry mouth, and alterations in the bacterial flora (Magán-Fernández et al., 2019; Borges et al., 2020; Gupta and Sahni, 2020; Larvin et al., 2020; Magán-Fernández et al., 2020; Aquino-Martinez and Hernández-Vigueras, 2021; Campisi et al., 2021; Gupta et al., 2021; Marouf et al., 2021).

As a conclusion, we can say that COVID-19 has been recently associated with periodontitis in various studies (Magán-Fernández et al., 2019; Borges et al., 2020; Gupta and Sahni, 2020; Larvin et al., 2020; Magán-Fernández et al., 2020; Aquino-Martinez and Hernández-Vigueras, 2021; Campisi et al., 2021; Gupta et al., 2021; Marouf et al., 2021; World Health Organization, 2021). Among the mechanisms of association between both diseases, we found the inflammatory and infectious nature of both diseases shares the pull of cytokines, ILs, increased CRP, and TNF- α , among others. On

the other hand, the entry pathway through the epithelia that expose a higher level of ACE2 receptors in patients with advanced periodontitis, and the increase in D-dimer present in patients with advanced periodontitis could be ways of association between both diseases. In the same way, the increase in ACE2 in periodontitis could be a reason for exacerbation of COVID-19.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

FUNDING

MA-CF is a recipient of a predoctoral fellowship from the Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU18/00854).

REFERENCES

- Anand, P. S., Jadhav, P., Kamath, K. P., Kumar, S. R., Vijayalaxmi, S., and Anil, S. (2021). A Case-Control Study on the Association between Periodontitis and Coronavirus Disease (COVID-19). *J. Periodontol.* 1, 1–7. doi:10.1002/JPER.21-0272
- Aquino-Martinez, R., and Hernández-Vigueras, S. (2021). Severe COVID-19 Lung Infection in Older People and Periodontitis. *Jem* 10 (2), 279. doi:10.3390/jem10020279
- Borges, L., Pithon-Curi, T. C., Curi, R., and Hatanaka, E. (2020). COVID-19 and Neutrophils: The Relationship between Hyperinflammation and Neutrophil Extracellular Traps. *Mediators Inflamm.* 2020, 8829674. doi:10.1155/2020/8829674
- Campisi, G., Bizzoca, M. E., and Lo Muzio, L. (2021). COVID-19 and Periodontitis: Reflecting on a Possible Association. *Head Face Med.* 17 (1), 16. doi:10.1186/s13005-021-00267-1
- Gupta, S., Mohindra, R., Chauhan, P. K., Singla, V., Goyal, K., Sahni, V., et al. (2021). SARS-CoV-2 Detection in Gingival Crevicular Fluid. *J. Dent. Res.* 100 (2), 187–193. doi:10.1177/0022034520970536
- Gupta, S., and Sahni, V. (2020). The Intriguing Commonality of NETosis between COVID-19 & Periodontal Disease. *Med. Hypotheses* 144, 109968. doi:10.1016/j.mehy.2020.109968
- Larvin, H., Wilmott, S., Wu, J., and Kang, J. (2020). The Impact of Periodontal Disease on Hospital Admission and Mortality during COVID-19 Pandemic. *Front. Med. (Lausanne)* 7, 604980. doi:10.3389/fmed.2020.604980
- Larvin, H., Wilmott, S., Kang, J., Aggarwal, V. R., Pavitt, S., and Wu, J. (2021). Additive Effect of Periodontal Disease and Obesity on COVID-19 Outcomes. *J. Dent. Res.* 100, 1228–1235. doi:10.1177/00220345211029638
- Magán-Fernández, A., O'Valle, F., Abadía-Molina, F., Muñoz, R., Puga-Guil, P., and Mesa, F. (2019). Characterization and Comparison of Neutrophil Extracellular Traps in Gingival Samples of Periodontitis and Gingivitis: A Pilot Study. *J. Periodontol. Res.* 54 (3), 218–224. doi:10.1111/jre.12621
- Magán-Fernández, A., Rasheed Al-Bakri, S. M., O'Valle, F., Benavides-Reyes, C., Abadía-Molina, F., and Mesa, F. (2020). Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Cells* 9 (6), 1494. doi:10.3390/cells9061494
- Marouf, N., Cai, W., Said, K. N., Daas, H., Diab, H., Chinta, V. R., et al. (2021). Association between Periodontitis and Severity of COVID-19 Infection: A Case-Control Study. *J. Clin. Periodontol.* 48 (4), 483–491. doi:10.1111/jcpe.13435
- Takahashi, Y., Watanabe, N., Kamio, N., Kobayashi, R., Iinuma, T., and Imai, K. (2020). Aspiration of Periodontopathic Bacteria Due to Poor Oral hygiene Potentially Contributes to the Aggravation of COVID-19. *J. Oral Sci.* 23 (631), 1–3. doi:10.2334/josnusd.20-0388
- World Health Organization (2021). *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. <https://covid19.who.int/> (Accessed Sep 22, 2020).

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors, and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Silvestre and Márquez-Arrico. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Journal section: Periodontology
Publication Types: Research

doi:10.4317/jced.59035
https://doi.org/10.4317/jced.59035

Adherence to supportive periodontal treatment in relation to patient awareness

María Navarro-Pardo ¹, Cecilia-Fabiana Márquez-Arrico ², Alba Pallarés-Serrano ³, Francisco-Javier Silvestre ^{2,4}

¹ Private dentist, postgraduated student University Hospital Doctor Peset, 46017 Valencia, Spain

² Department of Stomatology, University Hospital Doctor Peset-FISABIO, 46017 Valencia, Spain

³ Department of Periodontics, Catholic University of Valencia, 46001 Valencia, Spain

⁴ Department of Stomatology, University of Valencia 46010 Valencia, Spain

Correspondence:
C/ Juan de Garay 21
46017 Valencia-Spain
marianavarropardo@gmail.com

Navarro-Pardo M, Márquez-Arrico CF, Pallarés-Serrano AI, Silvestre FJ. Adherence to supportive periodontal treatment in relation to patient awareness. J Clin Exp Dent. 2022;14(1):e1-8.

Received: 01/10/2021
Accepted: 01/11/2021

Article Number: 59035 <http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm>
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
eMail: jced@jced.es
Indexed in:
Pubmed
Pubmed Central® (PMC)
Scopus
DOI® System

Abstract

Background: To evaluate the risk profile of noncompliant patients in relation to adherence to supportive periodontal therapy in order to identify factors associated with this profile, and be able to prevent the abandonment of periodontal therapy.

Material and Methods: This cross-sectional observational and comparative study was carried out on the patients who attended the Periodontics department of a University in Valencia (by a questionnaire and followed-up the periodontal supportive therapy through the medical history.) 220 patients were interviewed and gave their informed consent and data release permission before taking part in the study, which was approved by the Ethics Committee (UCV/2019-2020/048).

Results: 48.84% of self-reported patients were regular compliers, in contrast with 10.62% of referred patients. Those with acute symptoms were greater adherent than those patients who didn't present symptoms. Regarding patients undergoing surgical procedures, significant results were obtained: 69.70% showed adherence, in contrast with 18.67% patients with basic treatment. Results between men and women were similar. However, the age of the non-compliant patients was slightly older.

Conclusions: Self-reported patients presented a significantly higher degree of adherence to periodontal supportive therapy than the referred patients. Patients with acute symptoms presented higher adherence than those without them. Patients who underwent surgery presented a significantly higher degree of adherence than patients who received basic periodontal treatment. No conclusive data have been found regarding sex and age.

Key words: Awareness, periodontal disease, compliance, SPT.

Introduction

Periodontal diseases can be defined as inflammatory disorders caused by bacteria that affect the periodontium, which is composed of the gum, periodontal ligament,

cementum and alveolar bone. There are two main types of periodontal diseases: gingivitis, a mild and reversible form, and periodontitis, when inflammation progresses deeper into the tissues with the formation of periodontal

pockets and irreversible destruction of the periodontal ligament and bone damage which, in advanced cases, can lead to tooth loss (1,2).

Periodontal disease (PD) is considered a public health problem due to its high prevalence (it affects more than 50% of the adult population, making it the sixth most prevalent disease in the world) (3), its impact on quality of life (related to self-esteem and well-being) and the high cost of the treatment (4).

Periodontal treatment It includes behavioral change techniques, such as: oral-hygiene instructions; smoking-cessation and dietary intervention (5,6). These, followed by nonsurgical periodontal treatment (subgingival instrumentation to remove plaque and calculus) has been shown to control periodontal infection and to arrest progression of the disease in a significant number of cases. However, despite completion of nonsurgical treatment, a number of periodontal pockets, often remain. Therefore, surgical treatment is needed (7). Finally, the ongoing Supportive Periodontal Treatment (SPT), which begins once the active treatment just mentioned is completed. It involves regularly scheduled sessions depending on the long-term effectiveness of the treatment due to the chronic and multifactorial nature of the disease (5,6,8-11).

A problem facing periodontal treatment is the low adherence undergoing SPT once patients have completed the active part. Moreover, PD has been seen to be difficult to diagnose by patients making them not even start the treatment. The ability of patients to determine if they have PD known as "self-reported" patients is crucial, as recognition of the symptoms and/or signs of PD enables patients to seek help and treatment (12). Warning signs of PD can be gingival recession, mobility, bleeding gums or symptoms such as halitosis, sensitivity and pain. However, specialist treatment is not always sought due to the belief that tooth loss and mobility are inextricably linked to ageing (13-15). Most common reason for seeking medical and dental treatment are pain and discomfort like dental cavities, PD rarely causes acute pain, therefore, patient motivation towards periodontal treatment can be a challenging aspect (16).

Once a patient has been diagnosed with PD, great attention has been paid to identify the variables that affect treatment adherence like behavioral, cultural and economic factors. In addition, factors such as age, gender, type of treatment and patient satisfaction have been seen that could affect patient behavior (17-19).

Adherence is defined by the World Health Organization (WHO) as "the extent to which the patient follows medical instructions" (20) and includes the implication and commitment by the patient with his/her disease, its treatment and the therapist (15). To improve adherence patients must acquire an active role in the management process of the disease, increase their autonomy and their

capacity for self-care. They need to know the disease and understand it, as well as the prescribed treatment and the importance of fulfilling it. Despite the fact that prevention and treatment of this type of disease is nowadays predictable and successful, recent epidemiological studies have indicated a high lack of knowledge on the part of the population about PD (13,15,21).

As it has been found, periodontal awareness influences daily oral hygiene practices and routine periodontal care (22). Because of this, in the following investigation we studied the association between adherence to the SPT and the patients profile.

Material and Methods

This prospective observational and comparative study was carried out following the STrengthening the Reporting of OBServational studies in Epidemiology (STROBE) criteria on a total of 196 patients who were diagnosed with PD in the clinics of the Catholic University of Valencia from September 2016 to April 2019. Treatment follow-up was assessed by the clinical history in addition to a questionnaire to the patient about the reason for consultation and knowledge about PD. Participants gave their informed consent and data release permission before taking part in the study, which was approved by the Ethics Committee: UCV/2019-2020/048 where a favorable report was agreed.

Inclusion criteria were patients over 18 years of age, who had received basic active periodontal treatment (R.A.R) or surgery, from September 2016 to April 2020 and had been undergoing SPT for at least one year. Exclusion criteria were having any type of mobility impairment due to lack of dependability, terminally ill patients, pregnant women and patients with diseases that could affect the immune system such as HIV.

- Adherence to the SPT

The main variable to be examined was the degree of adherence to the SPT; this information was obtained by accessing to each patient's clinical history. The patients were classified according to the pattern of adherence to the SPT appointments: (23). Regular compliers (RC) if they were 100% compliant with the visits. Erratic compliers (EC): if they had not attended 50% of the scheduled SPT visits but had continued irregularly, and non-compliers (NC): patients who dropped out of the SPT.

- Reason for consultation

The reason for consultation was obtained by means of a validated patient questionnaire in which all the information was completed and the patients were classified into two groups: self-reported: (24) patients who attended on their own, concerned about the presence of some sign or symptom that they considered to be "not normal", characteristic of PD such as bleeding on brushing or spontaneous bleeding, visual signs of inflammation,

gingival retraction or pockets, mobility of some dental piece, sensitivity, bad taste in the mouth, halitosis, pain or discomfort. The other group was patients referred for a reason other than periodontal disease (24).

- Secondary variables

Other variables that were evaluated were the absence or presence of pain, where patients were classified as having acute pain or being asymptomatic (15). They were also classified according to whether they had received nonsurgical or surgical treatment (23) as well as the sex (25) and mean age of each group of patients (1).

- Sample size calculation

It was calculated that a random sample of 206 individuals would be sufficient to estimate, with a 95% confidence interval (CI) and a precision of ± 0.45 units, a population mean using this questionnaire, which was predicted to show a standard deviation of about 4 units. The replacement rate needed was predicted to be 20%.

- Statistical analysis

The statistical analysis was carried out using the SPSS 23 computer program using a confidence level of 95% and considering statistically significant those comparison results for which the p -value obtained is less than 0.05, so that if the p -value is less than 0.05 we reject the null hypothesis. Chi-square, Anova and Bonferroni test(s) were used for carry(ing) out the comparison of proportions.

Results

- Descriptive results

A total of 250 patients were selected, of those, 199 patients finally completed the study, applying the inclusion and exclusion criteria. Fifty-four patients were regular compliers (27.14%), 53 were erratic compliers (26.63%) and 92 were non-compliers (46.23%). According to the reason for consultation 86 were self-reported (43.22%) while 113 (56.78%) were referred. Patients that had no pain numbered 176 (88.44%) while 23 (11.56%) did feel pain. A number of 166 patients (83.42%) received nonsurgical periodontal treatment while 33 patients (16.58%) also underwent surgery. Half of the participants were male 99 (49.75%) and the other half female 100 (50.25%). The mean age of the sample was 54 years old. There were 66 patients in the 18 to 40 range, which is 33.16% of the sample, 68 in the 41-55 range (34.17%) and 65 patients over 55 (32.66%) (Table 1).

-Comparative analysis of the study variables

- Reason for consultation: The results we obtained in relation to the SPT were that, referring to the reason for consultation in the case of self-referred patients, 48.84% were regular compliers, 29.07% were erratic compliers and 22.09% were non-compliers in attending periodontal treatment support therapy. These self-referred patients (86 patients) 69.77% presented bleeding, 25.58% mobility, 24.42% halitosis, 24.42% gingival recession,

24.42% pain, 18.60% pockets, 18.60% sensitivity and 4.65% bad taste. In the case of referred patients (those who attended for any other reason not related to PD) 10.62% were regular compliers, 24.78% were erratic compliers and 64.60% were non-compliers in attending periodontal treatment support therapy (Fig. 1).

- Presence of pain: In reference to if presence of pain influenced compliance with SPT, 11.56% of patients presented pain. Of those, 65.22% were regular compliers, 17.39% were erratic compliers and 17.39% were non-compliant. Whereas, 88.44% of patients did not detect pain. Of those, 22.46% were regular compliers, 27.84% were erratic compliers and 50% were non-compliers (Fig. 2).

- Surgical/nonsurgical treatment: Depending on whether the patient had undergone basic periodontal treatment or surgical procedures, we discovered that of the patients who underwent surgical treatment, 69.70% were regular compliers, 15.15% were erratic compliers and 15.15% were non-compliant in attending SPT. In the case of patients who received basic periodontal treatment, 18.67% were regular compliers, 28.92% were erratic compliers and 52.41% were non-compliant with SPT (Fig. 3).

- Sociodemographic variables There wasn't any significant difference between the sexes (p -value 0,936). 28,28% of men were regular compliers, and it was 26,00% in the case of women. In the erratic compliers category, we obtained 26,26% of men and it was 27,00% of women. In the non-compliers category, we obtained 45,45% of men and 47,00% of women (Fig. 4).

The mean age for each group of patients with regular adherence was 52.04, the mean age of patients with erratic adherence was 52.04, and the mean age of non-adherent patients was 58.26. Using the Anova test, we found statistical evidence between age and adherence to the SPT. To see what this relationship was, we performed a Bonferroni test ($p=0.010$), in which statistical evidence was obtained to show that older patients were less adherent (Fig. 5).

Discussion

Given the chronic nature of the disease, long-term SPT is considered a critical pillar of successful treatment. Several studies have shown that in many cases patients give up SPT for different reasons such as age, gender and economic cost (15). In our study we were able to confirm this data since only a percentage of 27.14% showed regular compliance to the SPT, 26.63% showed erratic compliance and 46.23% of patients gave up treatment. Similar findings were obtained by Delatola C *et al.* 2014 (19) on compliance, where only half of the patients started SPT and only 10.5% continued to attend for 6 years. Renvert *et al.* 2004, found an average of 54% compliance among patients in nine studies in different countries. In many cases, the majority of patients did not attend

Table 1: Descriptive results. Relationship between; reason for consultation, pain detection, surgical intervention, sex and age and adherence to SPT. * Using a confidence level of 95% and considering those comparison results statistically significant for which the *p*-value obtained is less than 0.05. *

Variables Regular compliers			Total Erratic compliers	Pattern of adherence			<i>p</i> -value
				Non-compliers			
Reason for consultation	Self-referred	Recount	86	42	25	19	0,000
		%	100,00%	48,84%	29,07%	22,09%	
	referred	Recount	113	12	28	73	
		%	100,00%	10,62%	24,78%	64,60%	
Presence of pain	No	Recount	176	39	49	88	0,000
		%	88,44%	22,16%	27,84%	50,00%	
	Yes	Recount	23	15	4	4	
		%	11,56%	65,22%	17,39%	17,39%	
Surgical treatment	No	Recount	166	31	48	87	0,000
		%	100,00%	18,67%	28,92%	52,41%	
	Yes	Recount	33	23	5	5	
		%	100,00%	69,70%	15,15%	15,15%	
Sex	Men	Recount	99	28	26	45	0,936
		%	100,00%	28,28%	26,26%	45,45%	
	Women	Recount	100	26	27	47	
		%	100,00%	26,00%	27,00%	47,00%	
Age	18-40	Recount	66	52,07 (Mean age)	52,04 (Mean age)	58,26 (Mean age)	0,02
		%	100%				
	41-55	Recount	68				
		%	100%				
	>55	Recount	65				
		%	100%				

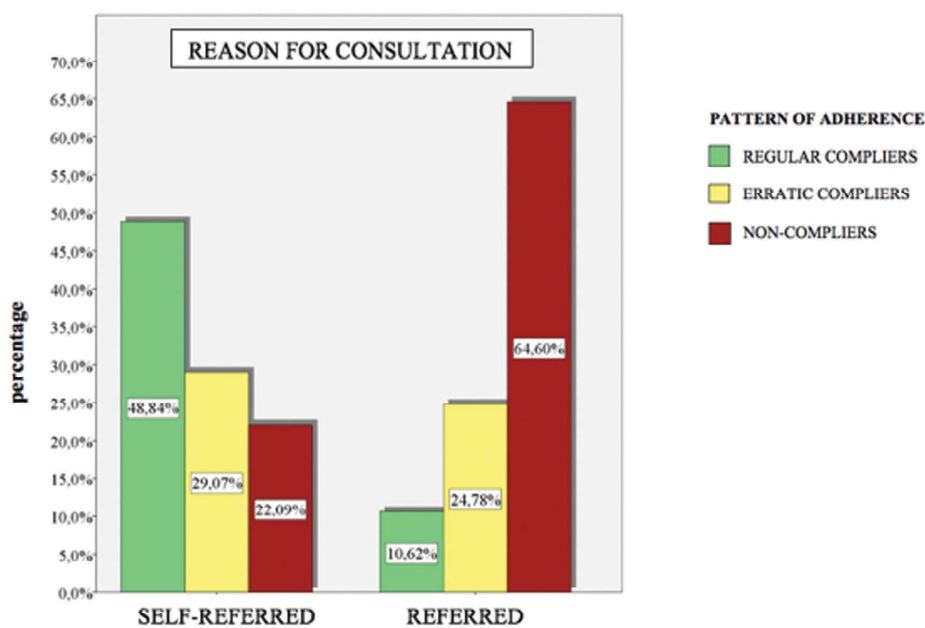


Fig. 1: Adherence to SPT depending on the reason for consultation.

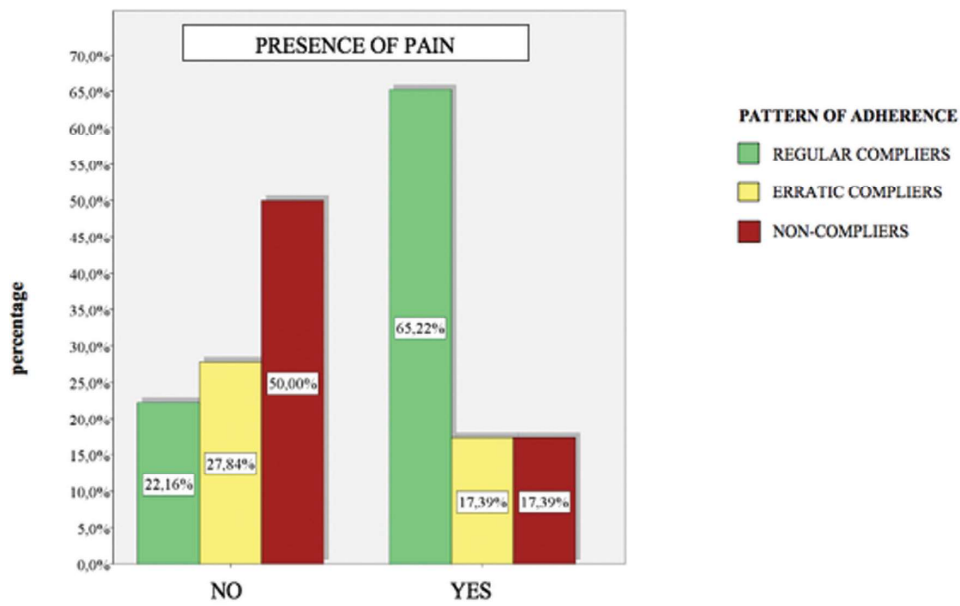


Fig. 2: Adherence to SPT and presence of pain.

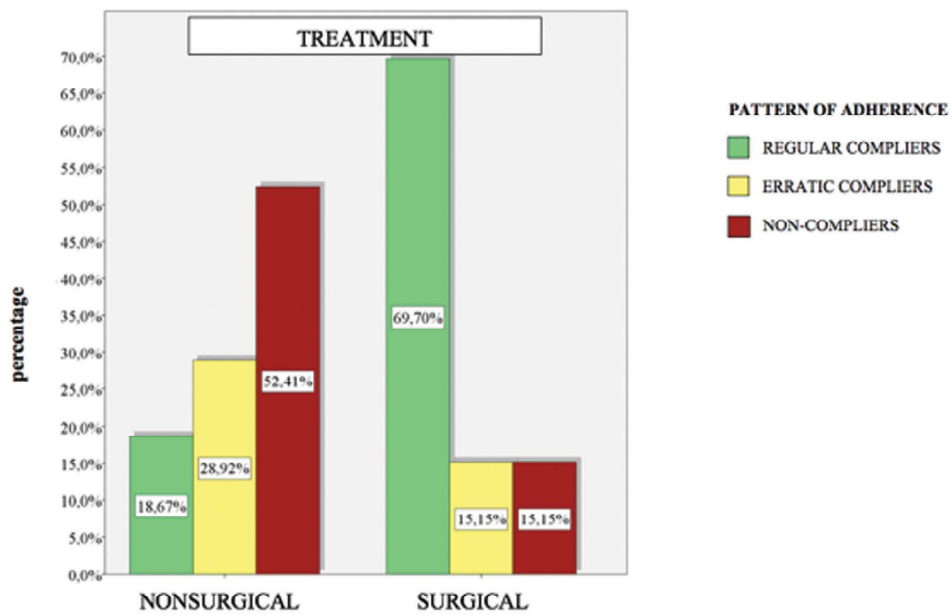


Fig. 3: Adherence to SPT and type of treatment received.

SPT programmes after the first and second year after active periodontal treatment, moreover, many did not even return for the first appointments (26) Soolari *et al.* 2003 also noted that the overall rate of regular compliance was 3.3%, in contrast with 57.6% erratic compliers and 39.1% non-compliers (27).

Knowing the great impact of this type of disease and the possibility of prevention, what is the reason for these high rates of periodontal disease? According to Echevarría *et al.* 2019, it may be due to three reasons: lack of

knowledge, skills or motivation (15).

In regard to the lack of knowledge, in our study approximately half of the patients came referred from another dental specialty such as orthodontics without the capacity for self-diagnosis of PD. This group of patients showed a statistically significant lower adherence to SPT than the self-referred patients. With regard to the referred patients, we observed that only 10.62% were regular adherents, 24.78% were erratic adherents and 64.60% were non-adherents to SPT.

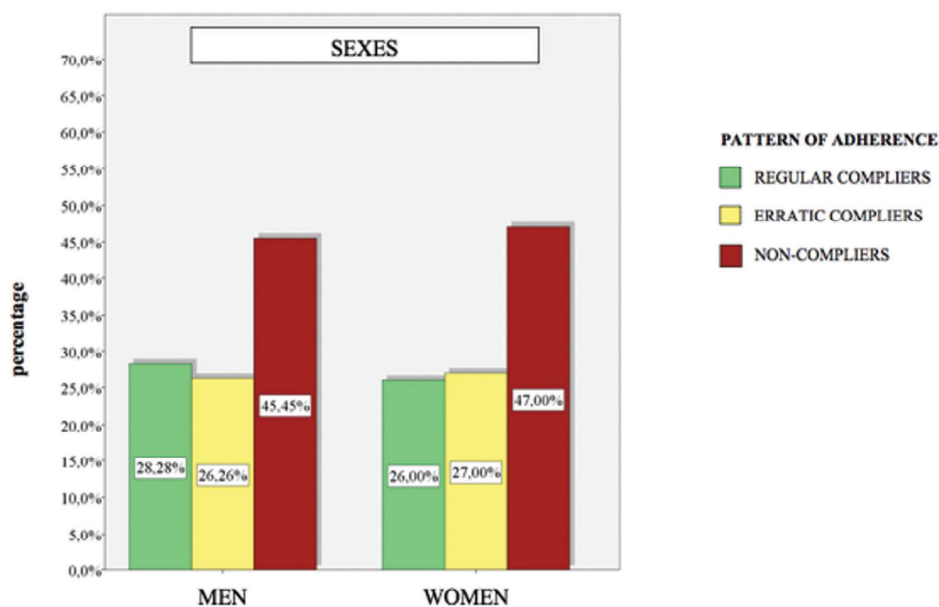


Fig. 4: Adherence to SPT between sexes.

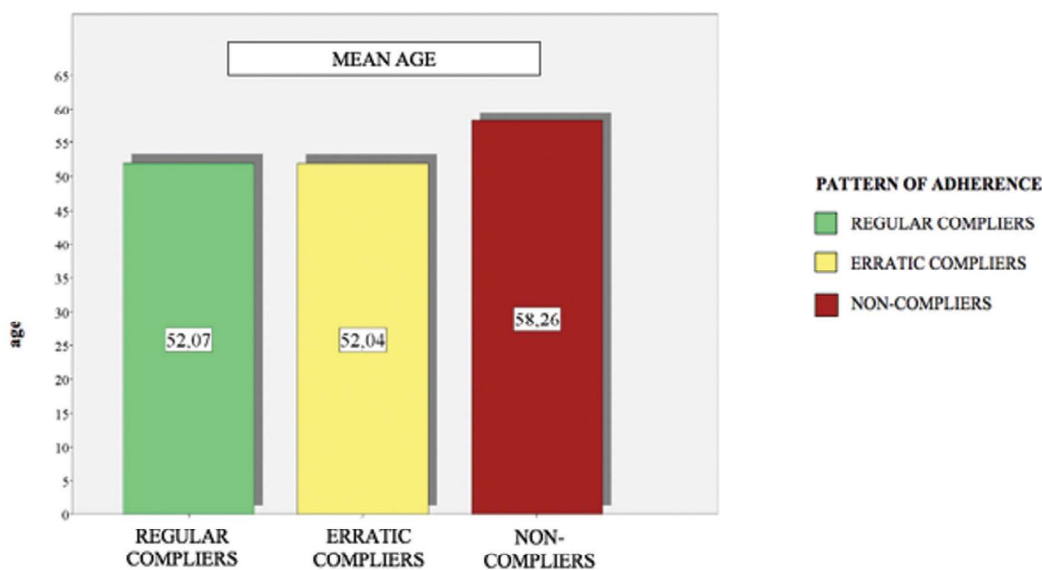


Fig. 5: Mean age of regulars, erratic and non-compliant patients.

In a clinical study conducted by Varela *et al.* 2019 they obtained similar findings regarding knowledge of the disease, where third of the participants had never heard of periodontitis, and only 1 in 5 respondents could be considered aware of the signs and symptoms of periodontal disease (1). Duque *et al.* 2011 observed a similar proportion of people who were unaware of the existence of PD. We could say that knowledge about PD is still very low and more oral health education is needed (28,29). Many times patients are not aware of the pathology because in most cases it does not cause pain, which is why it is considered a silent disease. The most common re-

ason for seeking medical and dental treatment is pain and discomfort, therefore, patient motivation towards periodontal treatment and even more SPT can be a challenging aspect (16).

In our study, the percentage of patients who had detected pain was low, 11.56%. All these patients were self-reported, where only 6.15% showed regular compliance. In contrast to our findings, Yeh *et al.* 2011 observed that patients with acute pain symptomatology were more likely to receive periodontal treatment. However, these patients were less likely to complete long-term treatment once the pain had subsided (30).

It has been studied how patient adherence also depends in part on the professional. A systematic review carried out by Newton JT *et al.* 2015 showed the importance of informing the patient, making them understand the benefits following the advice of professionals and thus achieve treatment success. If patients are aware of presenting pathology and have clear goals, monitoring their progress and planning behavioral change is associated with improved outcomes. However, change may not be persistent, for a variety of reasons that disrupts the individual's habits (31). Fardal *et al.* 2003 noted different cultural and geographical factors in relation to periodontal compliance (32).

Regarding adherence to SPT according to the type of treatment received, we observed that patients who received periodontal surgery were mostly compliant. This may be due to an awareness of the seriousness of the disease, the complex treatment and great economic cost, thus avoiding a second surgery. In the case of patients who have not undergone surgery, just 18.67% were compliant. Cardaropoli *et al.* 2012 also founded notable differences in adherence among patients who had undergone surgery, suggesting socioeconomic reasons to explain the differences (23). Soolari 2003 obtained similar findings where patients who had received surgery complied better with SPT as opposed to patients who did not undergo surgery (27).

Regarding age, different authors concurred that age influences adherence to SPT, showing greater adherence in older patients (33,34). Varela *et al.* 2019 obtained a mean age of 40 to 70 years with greater awareness and compliance with oral hygiene instructions (1). Whereas, other authors didn't find significant differences between non-compliant and compliant patients in terms of age and gender (32). Bansal *et al.* 2015 observed that the prevalence and severity of PD increased with advancing age because of possible immune impairment and tissue integrity which may increase the severity of the disease, thus may show greater involvement (35). Unlike Agarwal V *et al.* 2010 who advocated the cumulative effect of the untreated PD process over a period of time rather than the aging process (36).

Another sociodemographic variable we studied was sex, where we found no significant differences between men and women (1,19,32,33). However, Famili *et al.* 2010 conducted a study in which they observed that patient compliance was higher in the female sex (37). Bansal *et al.* 2015 advocated that men are less health conscious and have poorer oral hygiene than women (35).

Therefore, when a patient starts periodontal treatment, it will be of great importance to evaluate them and obtain the risk profile, in order to prevent them from giving up SPT and achieve long-term successful treatment.

The present study's main limitation was that there was just one sampling point. In addition, the sample selec-

tion was not random, all the patients were attending periodontics department. Nevertheless, the sample size was adequate and there was just one qualified interviewer so all the patients received the same information and followed the same criteria for classification. Moreover an exhaustive analysis was made, applying Pearson Chi-squared test, Anova, Bonferroni and proportions comparison test.

Conclusions

As a general conclusion it may be stated that there is an association between the compliance of the SPT and the individual patient-profile; adherence was significantly higher in self-reported patients, patients with acute symptomatology and ones who had underwent surgery. Whereas reported patients from other dental specialties, asymptomatic patients and those who had just received basic periodontal treatment (root scaling and planning) where much less compliant. Talking about gender, we didn't find conclusive data between men and women. Lastly, we obtained a slight difference between older patients being less compliant than younger ones.

References

- Varela Centelles P, Diz Iglesias P, Estany Gestal A, Blanco Hortas A, Bugarín González R, Seoane Romero JM, Blanco J. Periodontal awareness and what it actually means: a cross-sectional study. *Oral Dis.* 2019;25:831-838.
- Behal R, Majid Jan S, Hussain H. Evaluation of the effect of various factors on patient compliance among patients visiting Govt. Dental College and Hospital, Srinagar. *IAIM.* 2018;5:55-63.
- Thomson WM, Sheiham A, Spencer AJ. Sociobehavioral aspects of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2012;60:54-63.
- Mohd-Dom T, Ayob R, Mohd-Nur A, Abdul-Manaf MR, Ishak N, Abdul-Muttalib K, et al. Cost analysis of periodontitis management in public sector specialist dental clinics. *BMC Oral Health.* 2014;14:56.
- Graziani F, Karapetsa D, Alonso B, Herrera D. Nonsurgical and surgical treatment of periodontitis: how many options for one disease? *Periodontol 2000.* 2017;75:152-188.
- Krishna R, De Stefano JA. Ultrasonic vs. hand instrumentation in periodontal therapy: clinical outcomes. *Periodontol 2000.* 2016;71:113-127.
- Graziani F, Karapetsa D, Mardas N, Leow N, Donos N. Surgical treatment of the residual periodontal pocket. *Periodontol 2000.* 2018;76:150-163.
- Jonsson B, Baker SR, Lindberg P, Oscarson N, Ohn K. Factors influencing oral hygiene behaviour and gingival outcomes 3 and 12 months after initial periodontal treatment: an exploratory test of an extended Theory of Reasoned Action. *J Clin Periodontol.* 2012;39:138-144.
- Del Fabbro M, Nevins M, Venturoli D, Weinstein RL, Testori T. Clinically Oriented Patient Maintenance Protocol: A Clinical Consensus of Experts. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2018;38:281-288.
- Sonnenschein SK, Kohnen R, Ruetters M, Krisam J, Kim TS. Adherence to long term supportive periodontal therapy in groups with different periodontal risk profiles. *J Clin Periodontol.* 2020;47:351-361.
- Amerio E, Mainas G, Petrova D, Giner Tarrida L, Nart J, Monje A. Compliance with Supportive Periodontal/Peri-Implant Therapy: A Systematic Review. *J Clin Periodontol.* 2020;47:81-100.
- Airila-Mansson S, Bjurshammar N, Yakob M, Söder B. Self-reported oral problems, compared with clinical assessment in an epidemiological study. *Int J Dent Hyg.* 2007;5:82-86.
- Manresa C, Sanz-Miralles EC, Twigg J, Bravo M. Supportive pe-

riodontal therapy (SPT) for maintaining the dentition in adults treated for periodontitis. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;1:CD009376.

14. Midwood I, Davies M, Newcombe RG, West N. Patients' perception of their oral and periodontal health and its impact: a cross-sectional study in the NHS. *Br Dent J*. 2019;227:587-593.
15. Echeverría JJ, Echeverría A, Caffesse RG. Adherence to supportive periodontal treatment. *Periodontol 2000*. 2019;79(1):200-209.
16. Gokulanathan S, Balan N, Aravind RJ, Thangavelu K. Patient compliance and supportive periodontal therapy: Study among young adults of Namakkal district. *J Pharm Bioall*. 2014;6:S171-173.
17. König J, Plagmann HC, Langenfeld N, Kocher T. Retrospective comparison of clinical variables between compliant and non-compliant patients. *J Clin Periodontol*. 2001;28:227-232.
18. Costa FO, Cota LOM, Cortelli JR, Cortelli SC, Cyrino RM, Lages EJP, et al. Surgical and Non-Surgical Procedures Associated with Recurrence of Periodontitis in Periodontal Maintenance Therapy: 5-Year Prospective Study. *PLoS ONE*. 2015;10:e0140847.
19. Delatola C, Adonogianaki E, Ioannidou E. Non-surgical and supportive periodontal therapy: Predictors of compliance. *J Clin Periodontol*. 2014;41:791-796.
20. Sabaté E. WHO Adherence Meeting Report. Geneva: World Health Organization; 2001.
21. Aronson JK. Compliance, concordance, adherence. *Br J Clin Pharmacol*. 2007;63:383-384.
22. Jn LJ, Armitage GC, Klinge V, Lang NP, Tonetti M, Williams RC. Global oral health inequalities: task group- periodontal diseases. *Adv Dent Res*. 2011;23:221-226.
23. Cardaropoli D, Gaveglione L. Supportive periodontal therapy and dental implants: an analysis of patients' compliance. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23:1385-1388.
24. Petersen PE, Ogawa H. The global burden of periodontal disease: towards integration with chronic disease prevention and control. *Periodontol 2000*. 2012;60:15-39.
25. Arweiler NB, Auschill TM, Sculean A. Patient self-care of periodontal pocket infections. *Periodontology 2000*. 2017;76:164-179.
26. Renvert S, Persson GR. Supportive periodontal therapy. *Periodontol 2000*. 2004;36:179-195.
27. Soolari A, Rokn AR. Adherence to periodontal maintenance in Tehran, Iran. A 7- year retrospective study. *Quintessence International*. 2003;34:215-219.
28. Duque A, Cuartas C, Muñoz C, Salazar C, Sánchez Y. Periodontal knowledge in a sample of employees in Medellín. *Revista CES Odontología*. 2011;24:43-47.
29. Azodo CC, Ojehanon PI. Does any relationship exist between self-reported gingival bleeding, oral health perception, practices and concerns? *Niger Med J*. 2012;53:161-165.
30. Yeh HC, Lai H. Association between patients' chief complaints and their compliance with periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2011;38:449-456.
31. Newton JT, Asimakopoulou K. Managing oral hygiene as a risk-factor for periodontal disease: a systematic review of psychological approaches to behaviorchange for improved plaque control in periodontal management. *J Clin Periodontol*. 2015;42 (Suppl)16:S36-46.
32. Fardal O, Johannessen AC, Linden GJ. Compliance in a Norwegian periodontal practice. *Oral Health Prev Dent*. 2003;1:93-98.
33. Ojima M, Hanioka T, Shizukuishi S. Survival analysis for degree of compliance with supportive periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2001;28:1091-1095.
34. Ramseier CA, Kobrehel S, Staub P, Sculean A, Lang NP, Salvi GE. Compliance of cigarette smokers with scheduled visits for supportive periodontal therapy. *J Clin Periodontol*. 2014;41:473-480.
35. Bansal M, Mittal N, Singh TB. Assessment of the prevalence of periodontal diseases and treatment needs: A hospital-based study. *J Indian Soc Periodontol*. 2015;19:211-215.
36. Agarwal V, Khatri M, Singh G, Gupta G, Marya CM, Kumar V. Prevalence of periodontal diseases in India. *J Oral Health Community Dent*. 2010;4:7-16.

37. Famili P, Short E. Compliance with periodontal maintenance at the University of Pittsburgh: retrospective analysis of 315 cases. *Gen Dent*. 2010;58:e42-47.

Conflict of interest

The authors report no conflict of interest related to this study.

Journal section: Community and Preventive Dentistry
Publication Types: Review

doi:10.4317/jced.57362
https://doi.org/10.4317/jced.57362

COVID-19, A new challenge in the dental practice

Francisco-Javier Silvestre^{1,2}, Mayte Martínez-Herrera¹, Cecilia-Fabiana Márquez-Arrico², Javier Silvestre-Rangil¹

¹ Department of Stomatology, University of Valencia, Spain

² Stomatology Service, Hospital Universitario Dr. Peset-FISABIO

Correspondence:

Calle Juan de Garay 21, Stomatology
Hospital Universitario Dr. Peset
Valencia (46017), Spain
Cecilia.fabiana.m@gmail.com

Silvestre FJ, Martínez-Herrera M, Márquez-Arrico CF, Silvestre-Rangil J. COVID-19, A new challenge in the dental practice. J Clin Exp Dent. 2021;13(7):e709-16.

Received: 23/05/2020
Accepted: 23/01/2021

Article Number: 57362 <http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm>
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488
eMail: jced@jced.es
Indexed in:
Pubmed
Pubmed Central® (PMC)
Scopus
DOI® System

Abstract

Background: This review was conducted in order to learn the latest information about how to prevent cross-infection of COVID-19 in dentistry. The aim of this study is offer a clinical protocol to reduce the risk of infection of COVID-19 in dental settings.

Material and Methods: We carried out a review based on the PRISMA guide (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses). We used the following three databases: PubMed, Embase and Scopus. The search strategy was performed in the three databases applying the search terms “COVID-19 AND dental”, “COVID-19 AND dentistry”, selecting human studies published from November 2019 to May 2020. English publications regarding COVID-19 as the central topic of the research were eligible for inclusion, regardless of study design. There are very few published studies on the association between COVID-19 and dentistry, for that reason we also included the English abstract of two studies written in Chinese. The following exclusion criteria were established: animal studies and in vitro studies.

Results: The search identified a total of 212 articles, of which 54 were preselected, and 23 were finally included in the review on the basis of the inclusion and exclusion criteria. We collected all the information about routes of general and oral infection, dental patient evaluation and cross-infection control in Dental Clinic in the selected studies.

Conclusions: Cross infection in the dental clinic involve a very important risk due to the return to dental settings after periods of social isolation of the population after the epidemic outbreak of SARS-CoV-2. Therefore, we must take adequate and sufficient security measures to protect the patients and the dental clinic staff.

Key words: COVID-19, COVID-19 cross infection risk, COVID-19 prevention in Dentistry, COVID-19 in Dental Clinic.

Introduction

Coronavirus disease (COVID-19) is an infectious disease caused by a newly discovered coronavirus. It was discovered in Wuhan, a city of China, at the end of December 2019 and up to the present time, this disease has

rapidly spread in the form of a pandemic to most countries around the world (1). The World Health Organization (WHO) announced an international health emergency to this outbreak of severe pneumonia (January 30, 2020) (2). This novel coronavirus, officially named

as severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has been transmitted as a zoonosis from the reservoir in the Chinese bats (*Rhinolophus sinicus*) through some mammal being pangolins as the most likely intermediate host to the human (3). It is an RNA virus with a high transmission capacity between persons with a high infectivity index ($R_0 \approx 2.2$) (4). Due to the globalization and the ease of interconnection between countries has eased this virus, it has to spread widely around the world in a few weeks due to lack of prior immunity.

The sustained human-to-human spreads include direct transmission by droplets of saliva (5-10 μm) (cough, sneeze and droplet inhalation) and contact transmission by droplets deposition on surfaces (contact with nasal, oral and eye mucous) from the presymptomatic period to possibly after the disappearance of symptoms. Furthermore, it is suspected that there may be patients with hardly any symptoms who transmit it to a great extent (5). The virus can persist in various media from a few hours to 2-3 days (in stainless steel and plastic) (6). In addition, there may be a fecal-oral transmission and there is little data regarding a possible vertical transmission (from mothers to their newborns) (7).

To infect a cell, viruses use spike protein (SP) to bind the cell membrane, a process activated by specific cellular enzymes such as trypsin, furin, and cathepsin L. In the literature, it has been originally described that when the coronavirus enters the body, it binds to the human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) receptor from the cells through the S1 subunit of SP in the membrane envelope from coronavirus (8,9). ACE2 is enzyme that is critical to regulating processes such as blood pressure, wound healing and inflammation, in a biochemical pathway called the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS). The ACE enzyme converts angiotensin I into angiotensin II (ANG II). The main role of ACE2 is to break down angiotensin II into other molecules that counteract the effects of ANG II.

ACE2 helps modulate the many activities of the ANG II, that increases blood pressure and inflammation, increasing damage to blood vessel linings and various types of tissue injury (8,9). In certain tissues such as the lung, a large release of inflammatory mediators (cytokine storm) can occur as an excessive and inadequate inflammatory response (10). It can cause serious tissue damage by the action of certain enzymes (proteases). This situation can lead to severe respiratory distress in the adult with very severe respiratory failure (9-11). The high affinity between ACE2 and coronavirus S1 protein suggested that the population with higher expression of ACE2 might be more susceptible to SARS-CoV-2. Current observations suggest that people of all ages are generally susceptible to this new infectious disease, but in children the infection seems to be milder (7) and in general, older age and

the existence of underlying comorbidities (e.g., diabetes, hypertension, and cardiovascular disease) were associated with poorer prognosis (1). However, the pathophysiological mechanism of SARS-CoV-2 is continually being investigated and recently in early April it has been simulated that the virus "attacks" our haemoglobin A. Viral non-structural proteins (named "orf") dissociate heme on the 1-beta chain of hemoglobin into iron and porphyrin. The attack will lead to less hemoglobin to transport oxygen to human tissues (11,12). Therefore, it is thought that the virus may first infected cells with ACE2 receptors, including immune cells, which produced antibodies. Antibodies and red blood cells will generate immune hemolysis and then the virus will attack hemoglobin, as well as it will capture porphyrin and will inhibit heme metabolism, causing systemic damage to the human body.

The disease has 3 phases. A first infection with a high viral load (during the first 7-10 days). The incubation period of COVID-19 is usually 5 days on average (2 to 14 days), which is now the commonly adopted duration for quarantine of exposed persons (13). After incubation, the majority of patients experience a viral respiratory illness with fever and dry cough, although other symptoms such as sore throat, headaches, fatigue, and other atypical symptoms, such as muscle pain, loss of smell and taste, diarrhoea and vomiting may appear (1,7). In a second phase it can give an inflammatory pulmonary chart (around the 2nd week) and it can continue for a third critical phase with a hyperinflammation and respiratory, renal failure, arrhythmias, thrombosis because the elevation of D-dimer and fibrinogen degradation products facilitates the appearance of thromboembolism, and may end in a sepsis and fatal outcome (14).

Chest tomography (CT) appears to be the most sensitive clinical diagnostic test showing bilateral pneumonia, with ground glass-like infiltrates (14). The evolution is mild in 81%, severe in 14% and critical in 5% with significant mortality. Detection should be done by PCR and antibodies against viral antigen can also be detected (15). There are rapid tests that qualitatively detect the presence of IgG and IgM antibodies against SARS-CoV-2, however the most reliable diagnostic test is the PCR method. Treatment is in line with providing early diagnosis with isolation and supportive care for patients with COVID-19. Many clinical trials are currently underway. However, some protocols have been followed so far those seem to work better clinically. Non-clinical indication drugs are used to couple them to COVID-19. Antivirals are used early in the first week as lopinavir and ritonavir. Remdesivir which is much more active has also been used. Interferon, which may have some degree of synergy effect with lopinavir and ritonavir, is associated in the treatment of severe pneumonia, but some patients have shown no improvement with interfe-

ron treatment (16). Hydroxychloroquine has been used and would have a double effect, antiviral and anti-inflammatory on patients infected with COVID-19, but its effectiveness for COVID-19 is controversial (17). On the other hand, there are anti-inflammatory drugs that have to be administered approximately one week before the patient presents the hyperinflammation chart with severe pneumonia. Corticosteroids as well as IL-6 inhibitors such as tocilizumab have been managed (16,17). Due to the working characteristics in dental clinics, the risk of cross infection may be high among dentists and patients. For dental settings in countries that are affected with COVID-19, strict and effective infection control and action protocols are urgently needed. This article, based on relevant guidelines and recent research, introduces the essential knowledge about COVID-19 and risk of infection in dental settings and provides recommended management protocols for dental practitioners in affected areas. This review was conducted in order to answer the question: How to prevent cross-infection of COVID-19 in dentistry?

Material and Methods

We carried out a review based on the PRISMA guide (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) (18). We used the following three databases: PubMed, Embase and Scopus. All searches and title and abstract screenings, as well as study selection, were performed independently by two investigators. Discrepancies were resolved by consensus. The search strategy was performed in the three databases applying the search terms “COVID-19 AND dental”, “COVID-19 AND dentistry”, selecting human studies published the last 6 months (from November 2019 to May 2020). Publications regarding Covid-19 as the central topic of the research were eligible for inclusion, regardless of study design. Therefore, case reports, case series, correspondences and editorials were processed in order to identify COVID-19 prevention and control of cross-infection data. English studies were included. There are very few published studies on the association between COVID-19 and dentistry, for that reason we also included the English abstract of three studies written in Chinese (12,19,20). The following exclusion criteria were established: animal studies and *in vitro* studies. Once the articles had been identified, we carried out a screening by reading abstracts. The articles whose content was not adapted to COVID-19 and its relationship with cross-infection in dentistry were eliminated. Duplicated articles were also eliminated. The flowchart corresponding to the search process is shown in figure 1. We collected all the information about routes of general and oral infection, dental patient evaluation and cross-infection control in Dental Clinic in the selected studies.

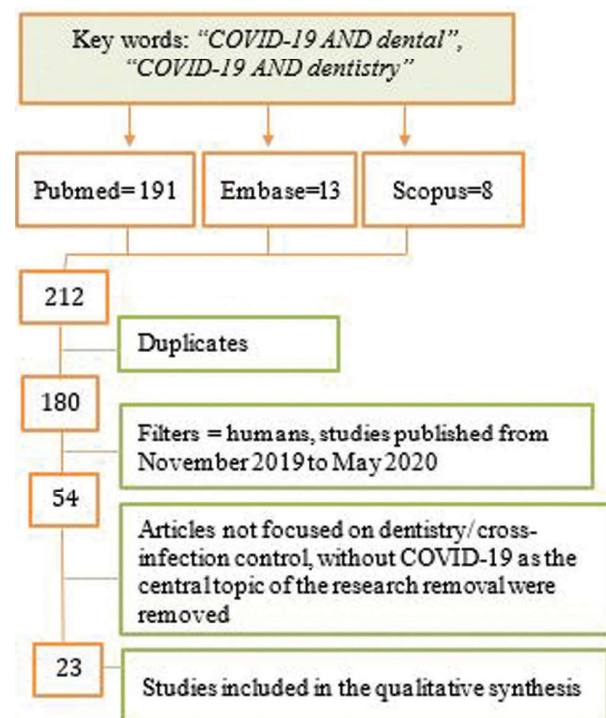


Fig. 1: Flow chart of the selection of articles for the review.

Results

The search identified a total of 212 articles, of which 54 were preselected, and 23 were finally included in the review on the basis of the inclusion and exclusion criteria. These 23 articles were described in table 1, 1 cont.

-Routes of general and oral infection

The SARS-CoV-2 virus can be transmitted over short distances (<2 meters), by respiratory and saliva droplets (Plügge) and emerging evidence suggested that it may also be indirectly transmitted through contact with contaminated surfaces (8,21). In addition, although the incubation period for individuals infected has been reported to be between 5 and 14 days, it was suspected that those without an evident clinical chart could transmit the infection (5). In the dental clinic, airborne propagation has been demonstrated since many dental procedures produce aerosols when rotating instruments with water spray are used (22). The use of anti-retraction handpieces is advised and encouraged during the COVID-19 pandemic, as these anti-retraction handpieces results in a significant reduction in the backflow of bacteria and virus from oral cavity into the tubes of the handpiece in comparison with a handpiece without anti-retraction function (23).

In addition, aerosols are mixed with saliva or blood drops of the patients and bioaerosols are created. These bioaerosols are microdroplets contaminated with bacteria and viruses that can be directly projected towards

Table 1: General characteristics of the studies included in the review.

Author Journal	Study Design	Conclusions
<i>Alharbi et al., 2020 (29)</i> <i>Saudi Dental J</i>	Narrative Literature Review	Is necessary develop guidelines for dental patients' management during and after the COVID-19. The actual recommendation is treat patients depending on whether they are Covid-19 infected and the type of treatment they require (urgent or non-urgent). Therefore, case and treatment categorisation should always be considered.
<i>Ather et al., 2020 (37)</i> <i>J Endod</i>	Narrative Literature Review	Initial screening via telephone to identify patients with suspected or possible COVID-19 infection can be performed remotely at the time of scheduling appointments. Dentists should follow standard, contact, and airborne precautions including the appropriate use of PPE and hand hygiene practices. Sequence for putting on PPE: gown, mask, goggles or face shield and gloves.
<i>Azzi et al., 2020 (28)</i> <i>J Infect</i>	Prospective cohort study n=25, mean age 61,5 years old	Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. The role of saliva in COVID-19 diagnosis could not be limited to a qualitative detection of the virus, but it may also provide information about the clinical evolution of the disease. It has been suggested that the oral cavity may play an active role in the pathogenesis of COVID-19.
<i>Coulthard et al., 2020 (30)</i> <i>Br Dent J</i>	Letter to the Editor	Dental drills cause the formation of aerosol and splatter commonly contaminated with bacteria, viruses, fungi and blood. The following measures are recommended: hand hygiene, PPE, pre-treatment peroxide of hydrogen mouthwash, rubber dam isolation, environmental disinfection and FFP2 or FFP3 respirator.
<i>Dave et al., 2020 (38)</i> <i>Lancet</i>	Correspondence	Dental and oral surgery procedures using drills or ultrasonic devices cause aerosol release, and routine dentistry has therefore been suspended in several countries. Testing for COVID-19 in dental professionals should be undertaken with the same high priority as that of medical health-care workers in hospitals.
<i>Fiorillo et al., 2020 (34)</i> <i>Int J Environ Res Public Health</i>	Narrative Literature Review	Surface disinfection could be performed with 0.1% sodium hypochlorite or 62%–71% ethanol for 1 minute. Disinfecting surfaces is one of the aspects to which to give greater attention, along with the washing of hands and the use of suitable PPE. In regards to PPE, surgical masks must be used by those who could transmit the virus, but those who work in contact with the patient's aerosol must use FFP2 and FFP3 masks.
<i>Ge et al., 2020 (22)</i> <i>J Zhejiang Univ Sci B</i>	Narrative Literature Review	Special precautions in routine practice: spatial separation of at least 1 m should be maintained between patients at the waiting area, handwashing, personal protective equipment, preprocedural mouth rinse, rubber dam isolation, removal/filter of contaminated air, environmental surface disinfection and others.
<i>Hua et al., 2020 (20)</i> <i>Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi</i>	Narrative Literature Review	Standard Prevention: Wear disposable work caps, disposable surgical masks, and work clothes, wear goggles or face masks, and disposable latex gloves or nitrile gloves if necessary. Advanced Protection: Wear standard prevention and face shields, work clothes plus disposable isolation suits or surgical clothing. Enhanced protection: wear advanced protection and disposable work hat, disposable medical FFP2 or FFP3 mask and leak-proof shoe covers.
<i>Khurshid et al., 2020 (25)</i> <i>Int J Environ Res Public Health</i>	Narrative Literature Review	Saliva collection is quite comfortable for patients as well as being easy, cheap, and non-invasive with minimal equipment required. The diagnostic capability of human saliva for identifying COVID-2019 could be a good screening test. It should also minimize the nosocomial transmission of 2019-nCoV to healthcare workers.
<i>Li et al., 2020 (12)</i> <i>Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi</i>	Narrative Literature Review	Efficient infection control can prevent the virus from further spreading. Special precautions in routine practice: mouth rinse before oral examination with povidone iodine 1% or cetylpyridinium chloride (0.05-0.10%), avoid aerosols, control of the dental environment, cleaning and ventilation frequently. It's urgent to implement an efficient infection control protocol.
<i>Lo Guidice. 2020 (35)</i> <i>Int. J Environ Res Public Health</i>	Feature Paper	It is necessary the use of PPE such as gloves, masks, visors, goggles, dental uniform, and surgical gown and shoes. A set of decontamination, disinfection, and sterilization procedures aimed at inactivating, destroying, or removing pathogens from any surface or instruments. The COVID-19 can be inactivated at a temperature of 56 °C for 30 min, as well as by 75% ethanol. It is not sensitive to chlorhexidine.
<i>Meng et al., 2020 (1)</i> <i>J Dent Res</i>	Narrative Literature Review	For dental practices and hospitals in countries/regions that are affected with COVID-19, strict and effective infection control protocols are urgently needed. The 4-handed technique is beneficial for controlling infection, the use of saliva ejectors with low or high volume can reduce the production of droplets and aerosols, the use of mask, gloves, rubber dam isolation, and other recommendations.

Table 1 cont.: General characteristics of the studies included in the review.

<i>Mupparapu et al., 2020 (36) Quintessence Int</i>	Editorial	Hand hygiene with soap and water or by using an alcohol-based hand sanitizer should be followed as always. All dental health care personnel should use PPE. Each patient should be asked for symptoms such as, high temperatures, runny nose, etc.
<i>Odeh et al., 2020 (33) Int. J. Environ. Res. Public Health</i>	Communication	Pre-screening patients for symptoms of COVID-19, by phone and/or upon arrival for treatment should be carried out. Available aerosol reduction, such as use of a rubber dam, availability of high speed evacuation, alternative treatment measures that might be employed. PPE must be used and to provide dental treatment.
<i>Peng et al., 2020 (21) Int J Oral Sci</i>	Narrative Literature Review	Drops and aerosol are produced during dental treatment. The COVID-19 has the potential to spread through droplets and aerosols from infected individuals in dental clinics. Special precautions in routine practice: evaluation of the patient, hand hygiene, previous mouth rinse, PPE, and use of rubber dum.
<i>Sabino-Silva et al., 2020 (26) Clin Oral Investig</i>	Letter to the Editor	Saliva can have a pivotal role in the human-to-human transmission, and non-invasive salivary diagnostics may provide a convenient and cost-effective point-of-care platform for the fast and early detection of COVID-19 infection.
<i>Spagnoulo et al., 2020 (39) Int J Environ Res Public Health</i>	Overview	When the dentists treat patients, they should intercept the potentially infected person before they reach the operating areas. The management practice of the operating area should be quite similar to what happens with other patients affected by infectious and highly contagious diseases. Handpieces must be equipped with anti-reflux devices to avoid contaminations, improving the risk of cross-infections.
<i>The French Society of Stomatology, Maxillo-Facial Surgery and Oral Surgery 2020 (32) J Stomatol Oral Maxillofac Surg</i>	Professional guidelines	Recommendations PPE, FFP2 mask, glasses or large face shields, and gloves, hand cleaning should include all fingers, digital spaces, palms, backs of hands and clipped nails. Between two patients and at the end of the consultation, systematically bio-clean the equipment and objects entering into contact with the patient (chin, hands, etc.), using a usual disinfectant detergent containing at least one quaternary ammonium (support and handles of X-ray equipment, chair arms, door handles, etc.).
<i>Wang et al., 2020 (19) Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban</i>	Narrative Literature Review	It is important to maintain oral health in children at home to maintain good health. Therefore, its necessary develop good oral habits (brushing teeth properly at home) and healthy dietary habits. When dental emergencies occur they should visit the dental clinic with adequate protection.
<i>Xu et al., 2020 (24) Int J Oral Sci</i>	Experimental design	ACE2 is the main host cell receptor of COVID-19. The expression of the ACE2 receptor in the oral mucosa was explored. This receptor is expressed in the epithelial cells of the mucosa, especially in the tongue cells. The oral mucosa could be an infection focus to COVID-19.
<i>Yang et al., 2020 (31) Chin J Dent Res</i>	Narrative Literature Review	The healthcare personnel of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery are especially vulnerable to the infection due to their extensive and close exposure to patients' oral and nasal cavities and secretions. Special precautions in routine practice: evaluation of the patient, hand hygiene, previous mouth rinse, PPE, use of rubber dum and avoiding aerosols and disinfection of the environment.
<i>Zimmermann et al., 2020 (40) J Craniomaxillofac Surg</i>	Narrative Literature Review	The use of PPE should be selected adequately (depending on the planned procedure and infection status) and used appropriately. There even might be the need for a training of the staff concerning how to put on, remove, and dispose of the equipment. For any type of surgery performed on patient FFP3 respirator/N99 respirator/equivalent, disposable sterile gown, sterile gloves, surgical hood cap and eye protection should be used.
<i>Zhao et al., 2020 (41) Br J Oral Maxillofac Surg</i>	Narrative Literature Review	First level protection: wearing work clothes, disposable work caps, disposable surgical masks, disposable isolation clothes and disposable latex gloves. Second level protection: wearing disposable working cap, medical protective mask (N95), protective glasses, protective clothing or protective screen, disposable protective clothing or disposable impermeable isolation clothing, disposable latex gloves, and disposable shoe cover if necessary. Third level protection: on the basis of second level protection using full face shield, full face respirator or positive pressure head cover.

PPE: personal protective equipment

the operator involving a potential risk of transmission. Likewise, these microdroplets have the potential to float in the air for a considerable amount of time or the patient can cough or sneeze and leave the work environment contaminated (22). Furthermore, there could be secondary clinical contamination through a wound from the use of sharp or cutting instruments, and even from direct contact with the mucosa.

ACE2 has been shown to be the main host receptor for virus entry. ACE2 receptors are highly expressed in the lung, colon, and kidneys among other tissues. The expression of these receptors have also been verified in the oral mucosa, particularly in the epithelial cells of the tongue, in the buccal and gingival mucosa (24). Therefore, the oral cavity could be considered a source of infectious risk for COVID-19 and should be taken into account when establishing prevention strategies for the treatment of patients in the dental clinic.

The presence of the virus in saliva has been demonstrated, so it may have a fundamental role in the oral transmission of the virus (25,26). It has been suggested that the SARS-CoV-2 can be observed in saliva by three different routes: first, the virus can get from the upper respiratory tract to the mouth. Secondly, through the crevicular fluid along with other elements from the serum. Finally, by infection of the salivary glands with direct release of the virus in the saliva through the drainage channels. In fact, salivary gland infection has been seen in animals (*Macacus Rhesus*) (11). Also, in experimental animal models, it has been seen specific SARS-CoV-2 A-Immunoglobulins secreted by saliva (27). It is even proposed that saliva can be a tool to detect the SARS-CoV-2 (28).

Due to the special characteristics of the dental settings, strict protective measures during dental examination and treatment of the patients must be taken to be effective to prevent the spread of infection by this novel coronavirus. Therefore, certain modifications of standard precaution and infection control regimen targeted toward COVID-19 is essential during this outbreak.

-Dental patient evaluation

Previous phone screening

When a patient requests a visit, the possibility of infection should be identified through a basic telephone evaluation by asking about symptoms. It is necessary to identify the reason for the appointment. To clarify if it is a dental emergency, we will ask to the patient: Where exactly is the pain? When did it start, was it constant/intermittent, gradual/ sudden? No patient should come without a previous screening by phone. Telephone questions should be able to identify a suspected case of COVID-19. Patients should be asked for any COVID-19 symptoms and any recent contact with positive confirmed COVID-19 individuals, or whether the patient has passed the disease and how long he/she has been dis-

charged. Moreover, we will ask if he/she has had fever, sore throat or cough in the last 2 weeks, as well as if he/she had diarrhoea or respiratory fatigue. It is important to know the type of occupation and if it is related to healthcare or socio-healthcare. After this screening, any suspected or confirmed COVID-19 patients' treatment should be postponed if possible for a few weeks unless it is a dental emergency (29,30).

-Clinical examination

The patient must come alone to the appointment unless he/she is a minor, a disabled person or an elderly person. He/she must come to the appointment at the agreed time to avoid having more patients in the waiting room and he/she must come with the mask on. Upon arrival at the dental clinic, he/she should rub his/her hands with a hydroalcoholic solution and then wash his/her hands with soap and water for at least 40 seconds. Dental professionals should be familiar with how this novel virus is spread, how to identify patients with COVID-19 infection, and what extra-protective measures should be adopted during the practice, in order to prevent the transmission of COVID-19 (30). In addition, every visit should be used to implement preventive measures in maintaining proper oral health at home during the outbreak, especially in children (31). Before beginning the oral examination or dental treatment, the patient should perform a mouthwash with 1% hydrogen peroxide or 0.2% povidone for 1 minute (12,32).

-Cross-infection control in Dental Clinic

Dental clinics stopped their activity except in the cases of dental emergencies in the various countries affected by the pandemic during the period of the outbreak to prevent the spread of the virus. However, after the pandemic outbreak, a restructuring will be necessary in the way of treating to patients with stricter preventive measures (32-42).

-Cross-infection control according to risk areas

The different areas of the dental clinic must be considered for proper cleaning and disinfection taking into account the possible degree of exposure to the infection. There are areas of lower exposure (low risk) such as the reception or the waiting room where the accumulation of patients should be avoided by means of correctly arranged appointments. There are other areas of greater possibility of infectious exposure (high risk), such as the dental office, the operating room and the disinfection and sterilization room (32-41). Cleaning and disinfection of all clinic surfaces is necessary, including door handles, chairs and all types of surfaces in the clinical environment. Keyboards, screens, curing lamps, ultrasound equipment, and other technical equipment within the dental cabinet should be covered with plastic wrap. It is convenient to have all the necessary equipment prepared in the work area before starting the treatment to avoid opening drawers and wardrobes when the patient is in the cabinet.

The cleaning and disinfection of the different surfaces will be carried out with a usual disinfectant for these areas (such as 70-75% ethanol solution) or with a 0.1% sodium hypochlorite solution, applying with sprays and a disposable cloth (35).

-Ventilation systems

Installation of enhanced air ventilation systems in dental cabinets can also help to facilitate the elimination of airborne pathogens and reduce the risk of infection (43). There are several methods to remove / filter contaminated air in treatment areas; one of the most commonly used devices is the high volume evacuator (HVE). It is the easiest way to remove dental aerosols as they are generated and could effectively reduce contamination caused by the operating site by 90%. The HVE is a suction device that helps remove air at a rate of up to 2.83 m³ per minute (42).

-Prevention of aerosols spread during dental treatment

If it is possible, the rubber dam should be placed because it prevents the formation of aerosols or splashes and a powerful aspiration must be placed (23). It is also convenient to use the high-speed handpiece with anti-retractive valves. A point where all current protocols coincide is the risk during dental treatment due to the formation of aerosols. These aerosols can be avoided with the use of a powerful surgical suction. In addition, studies have demonstrated that this backflow could occur during simultaneous use of other evacuation (high-volume) equipment. Thus, the use of a single saliva ejector, preferably the high-volume evacuator is recommended (23,42,43). Once the treatment is finished, the material should be left in a trough with disinfectant liquid to proceed to clean it later and once it has been thoroughly rinsed and dried, it is placed in the sealed sterilization bags following the usual procedure. The material is sterilized in the autoclave following the sterilization protocols for surgical instrument. The clinical waste generated by the treatment of patients will be considered as infectious medical waste and should go to double-layer yellow colour medical waste package bags with "gooseneck" ligation. The surface of the package bags should be marked and disposed according to the requirement for the management of infectious medical waste (21).

Discussion

It has been studied how the dentist is a health professional who presents a high risk of exposure to the COVID-19 (32-41). Regarding the personnel clinic, the first important measure to reduce the risk of cross infection is cleaning and disinfecting hands (32-41). Hand hygiene should be carried out before putting on gloves for the clinical examination of the patient or dental procedure and after finishing the treatment. Of course, at all times the dentist or assistant will avoid touching his/her mouth, nose or eyes. Personal protective equipment (PPE) must be used

appropriately, such as a mask "Filtering Face Pieces class 2" (FFP2) or class 3 (FFP3), latex or vinyl long-sleeved gloves that are well suited, surgical cap, well-fitted protective glasses or goggles and face shield. All the clinic staff should wear specific footwear with disposable wipes and a waterproof operating gown over the clinical uniform (32). All authors agree on the importance of the sequence of placement of PPE, affecting its effectiveness (32-41). The protocol for placing should be clear and all staff must know it (32-41). PPE placement sequence: first put on shoe covers, then wash your hands for 40 seconds, then put on the waterproof gown, then the mask (FFP2 or FFP3) from behind, then the goggles, then the surgical cap, then the face shield and finally we will put on a pair of latex or vinyl long-sleeved gloves (32).

PPE removal sequence: just after the dental treatment, we will remove the face shield and then a pair of gloves to manipulate the patient's medical history, then we will remove the gown and the surgical cap, then we will clean the other gloves with hydroalcoholic disinfectant gel and we will remove the well-fitted protective glasses and the mask, and finally we will remove the other gloves and wash our hands.

To summarise, the results of the present review supports the high risk of COVID-19 cross infection among dentists and patients. Cross infection in the dental clinic involve a very important risk due to the return to dental settings after periods of social isolation of the population after the epidemic outbreak of SARS-CoV-2 (12). Therefore, we must take adequate and sufficient security measures to protect the patients and the dental clinic staff.

References

- Meng L, Hua F, Bian Z. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Emerging and future challenges for dental and oral medicine. *J Dent Res.* 2020;99:481-7.
- Mahase E. China coronavirus: WHO declares international emergency as death toll exceeds 200. *BMJ.* 2020;368:m408.
- Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579:270-3.
- Swerdlow D, Finelli L. Preparation for possible sustained transmission of 2019 novel coronavirus: Lessons from previous epidemics. *JAMA.* 2020;323:1129-30.
- Pan X, Chen D, Xia Y, Wu X, Li T, Ou X, et al. Asymptomatic cases in a family cluster with SARS-CoV-2 infection. *Lancet Infect Dis.* 2020;20:410-1.
- Kampf G, Todt D, Pfaender S, Steinmann E. Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *J Hosp Infect.* 2020;104:246-51.
- Zhu H, Wang L, Fang C, Peng S, Zhang L, Chang G. Clinical analysis of 10 neonates born to mothers with 2019-nCoV pneumonia. *Transl Pediatr.* 2020;9:51-60.
- He J, Tao H, Yan Y, Huang S, Xiao Y. Molecular mechanism of evolution and human infection with SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020;12:428.
- Hasan A, Paray BA, Hussain A, Qadir FA, Attar F, Aziz FM, et al. A review on the cleavage priming of the spike protein on coronavirus by angiotensin-converting enzyme-2 and furin. *J Biomol Struct Dyn.* 2021;39:3025-3033.

10. Gheblawi M, Wang K, Viveiros A, Nguyen Q, Zhong JC, Turner AJ, et al. Angiotensin-Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin-Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2. *Circ Res.* 2020;126:1456-74.
11. Liu L, Wei Q, Alvarez X, Wang H, Du Y, Zhu H, et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J Virol.* 2011;85:4025-30.
12. Li ZY, Meng LY. Prevention and control of novel coronavirus infection in department of stomatology. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2020;55:217-22.
13. Burhan E, Prasenohadi P, Rogayah R, Isbaniyah F, Reisa T, Dharmawan I. Clinical Progression of COVID-19 Patient with Extended Incubation Period, Delayed RT-PCR Time-to-positivity, and Potential Role of Chest CT-scan. *Acta Med Indones.* 2020;52:80-3.
14. Kokkinakis I, Selby K, Favrat B, Genton B, Cornuz J. Covid-19 diagnosis: clinical recommendations and performance of nasopharyngeal swab-PCR. *Rev Med Suisse.* 2020;16:699-701.
15. Ye X, Luo Y, Xia S, Sun Q, Ding J, Zhou Y, et al. Clinical efficacy of lopinavir/ritonavir in the treatment of Coronavirus disease 2019. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2020;24:3390-6.
16. Gautret P, Lagier JC, Parola P, Hoang VT, Meddeb L, Mailhe M, et al. Hydroxychloroquine and azithromycin as a treatment of COVID-19: results of an open-label non-randomized clinical trial. *Int J Antimicrob Agents.* 2020;56:105949.
17. Fu B, Xu X, Wei H. Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19? *J Transl Med.* 2020;18:164.
18. Hutton B, Catalá-López F, Moher D. The PRISMA statement extension for systematic reviews incorporating network meta-analysis: PRISMA-NMA. *Med Clin (Barc).* 2016;147:262-6.
19. Wang Y, Zhou CC, Shu R, Zou J. Oral health management of children during the epidemic period of coronavirus disease 2019. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2020;51:151-4.
20. Hua C, Liu Z, Wang Q, Yang Z, Xu Q, Zhang J. Strategy of dental clinics to cope with the epidemic period of infectious diseases based on the experience of corona virus disease outbreak. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2020;38:117-21.
21. Peng X, Xu X, Li Y, Cheng L, Zhou X, Ren B. Transmission routes of 2019-nCoV and controls in dental practice. *Int J Oral Sci.* 2020;12:9.
22. Ge ZY, Yang LM, Xia JJ, Fu XH, Zhang YZ. Possible aerosol transmission of COVID-19 and special precautions in dentistry. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2020;21:361-8.
23. Barabari P, Moharamzadeh K. Novel Coronavirus (COVID-19) and Dentistry-A Comprehensive Review of Literature. *Dent J (Basel).* 2020; 8:E53.
24. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020;12:8.
25. Khurshid Z, Asiri F, Al Wadaani H. Human saliva: Non-invasive fluid for detecting novel coronavirus (2019-nCoV). *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:2225.
26. Sabino-Silva R, Jardim ACG, Siqueira WL. Coronavirus COVID-19 impacts to dentistry and potential salivary diagnosis. *Clin Oral Investig.* 2020;24:1619-21.
27. Lu B, Huang Y, Huang L, Li B, Zheng Z, Chen Z, et al. Effect of mucosal and systemic immunization with virus-like particles of severe acute respiratory syndrome coronavirus in mice. *Immunology.* 2010;130:254-61.
28. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina D, Geroni A, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect.* 2020; 81:e45-50.
29. Alharbi A, Alharbi S, Alqaidi S. Guidelines for dental care provision during the COVID-19 pandemic. *Saudi Dent J.* 2020; 32:181-6.
30. Coulthard P. Dentistry and coronavirus (COVID-19)-moral decision-making. *Br Dent J.* 2020; 228:503-5.
31. Yang Y, Soh HY, Cai ZG, Peng X, Zhang Y, Guo CB. Experience of Diagnosing and Managing Patients in Oral Maxillofacial Surgery during the Prevention and Control Period of the New Coronavirus Pneumonia. *Chin J Dent Res.* 2020;23:57-62.
32. French Society of Stomatology, Maxillo-Facial Surgery and Oral Surgery (SFSCMFSCO). Practitioners specialized in oral health and coronavirus disease 2019: Professional guidelines from the French society of stomatology, maxillofacial surgery and oral surgery, to form a common front against the infectious risk. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2020;121:155-8.
33. Odeh N, Babkair H, Abu-Hammad S, Borzangy S, Abu-Hammad A, Abu-Hammad O. COVID-19: Present and Future Challenges for Dental Practice. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:E3151.
34. Fiorillo L, Cervino G, Matarese M, D'Amico C, Surace G, Paduano V, et al. COVID-19 Surface Persistence: A Recent Data Summary and Its Importance for Medical and Dental Settings. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17: E3132.
35. Lo Giudice R. The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS CoV-2) in Dentistry. Management of Biological Risk in Dental Practice. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17: E3067.
36. Mupparapu M. Editorial: Dental practitioners' role in the assessment and containment of coronavirus disease (COVID-19): Evolving recommendations from the Centers for Disease Control. *Quintessence Int.* 2020;51:349-50.
37. Ather A, Patel B, Ruparel N, Diogenes A, Hargreaves K. Coronavirus Disease 19 (COVID-19): Implications for Clinical Dental Care. *J Endod.* 2020;46:584-95.
38. Dave M, Seoudi N, Coulthard P. Urgent dental care for patients during the COVID-19 pandemic. *Lancet.* 2020;395:1257.
39. Spagnuolo G, De Vito D, Rengo S, Tatullo M. COVID-19 Outbreak: An Overview on Dentistry. *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17:E2094.
40. Zimmermann M, Nkenke E. Approaches to the Management of Patients in Oral and Maxillofacial Surgery During COVID-19 Pandemic. *J Craniomaxillofac Surg.* 2020;48:521-6.
41. Zhao Z, Gao D. Precaution of 2019 Novel Coronavirus Infection in Department of Oral and Maxillofacial Surgery. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2020;58:250-3.
42. Narayana TV, Mohanty L, Sreenath G, Vidhyadhari P. Role of pre-procedural rinse and high volume evacuator in reducing bacterial contamination in bioaerosols. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016;20:59-65.
43. Villafruela JM, Olmedo I, Berlanga FA, Ruiz de Adana M. Assessment of displacement ventilation systems in airborne infection risk in hospital rooms. *PLoS One.* 2019;14:e0211390.

Authors' contributions

Their individual contributions to the study was: Francisco Javier Silvestre: study design, data collection, analysis of the results, interpretation and drafting of the manuscript; Mayte Martínez-Herrera: study design and drafting of the manuscript and English translation; Cecilia Fabiana Márquez-Arrico: study design, analysis of the results, interpretation and drafting of the manuscript; Javier Silvestre Rangil: analysis of results, drafting on the manuscript and providing final approval of the version to publish.

Source of funding

CFMA is a recipient of a predoctoral fellowship from Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU18/00854).

Conflict of interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article. CFMA is a recipient of a predoctoral fellowship from Ministry of Science, Innovation and Universities (FPU18/00854).



Article

Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Oxidative Stress Markers in Leukocytes and Their Interaction with the Endothelium in Obese Subjects with Periodontitis: A Pilot Study

Mayte Martínez-Herrera ^{1,2,†} , Zaida Abad-Jiménez ^{3,†}, Francisco Javier Silvestre ^{1,2}, Sandra López-Domènech ³ , Javier Silvestre-Rangil ², Cecilia Fabiana Márquez-Arrico ^{1,2} , Víctor M. Víctor ^{3,4,5,*} and Milagros Rocha ^{3,4,*}

¹ Department of Stomatology, University of Valencia, Gascó i Oliag 1, 46010 Valencia, Spain; maytemartinez05@gmail.com (M.M.-H.); francisco.silvestre@uv.es (F.J.S.); cecilia.fabiana.m@gmail.com (C.F.M.-A.)

² Department of Stomatology, University Hospital Doctor Peset-FISABIO, Av. Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain; javier.silvestre@uv.es

³ Department of Endocrinology and Nutrition, University Hospital Doctor Peset-FISABIO, Av. Gaspar Aguilar 90, 46017 Valencia, Spain; zaiaji@alumni.uv.es (Z.A.-J.); Sandra.Lopez@uv.es (S.L.-D.)

⁴ CIBER CB06/04/0071 Research Group, CIBER Hepatic and Digestive Diseases, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 15, 46010 Valencia, Spain

⁵ Department of Physiology, University of Valencia, Av. Blasco Ibáñez 15, 46010 Valencia, Spain

* Correspondence: victor.victor@uv.es (V.M.V.); milagros.rocha@uv.es (M.R.); Tel.: +34-963-189-132 (V.M.V. & M.R.)

† These authors contributed equally to this work.

Received: 16 May 2020; Accepted: 1 July 2020; Published: 4 July 2020



Abstract: Aim: The primary objective of this pilot study was to evaluate the effect of non-surgical periodontal treatment. The secondary aim was to evaluate the effect of dietary therapy on both parameters of oxidative stress in leukocytes and leukocyte-endothelial cell interactions in an obese population. Methods: This was a pilot study with a before-and-after design. Forty-nine obese subjects with periodontitis were randomized by means of the minimization method and assigned to one of two groups, one of which underwent dietary therapy while the other did not. All the subjects underwent non-surgical periodontal treatment. We determined periodontal, inflammatory and oxidative stress parameters—total reactive oxygen species (ROS), superoxide production, intracellular Ca²⁺, mitochondrial membrane potential and superoxide dismutase (SOD) activity. We also evaluated interactions between leukocytes and endothelium cells—velocity, rolling flux and adhesion—at baseline and 12 weeks after intervention. Results: Periodontal treatment improved the periodontal health of all the patients, with a reduction in serum retinol-binding protein 4 (RBP4), total superoxide production and cytosolic Ca²⁺ in leukocytes. In the patients undergoing dietary therapy, there were less leukocyte adhesion to the endothelium, an effect that was accompanied by a decrease in TNF α , P-selectin and total ROS and an increase in SOD activity. Conclusions: Whereas non-surgical periodontal treatment induces an improvement in leukocyte homeostasis, dietary therapy as an adjuvant reduces systemic inflammation and increases antioxidant status which, in turn, modulates leukocyte-endothelium dynamics.

Keywords: periodontitis; reactive oxygen species; oxidative stress; endothelial dysfunction; periodontal treatment; dietary therapy; obesity

1. Introduction

Obesity is a chronic inflammatory disease associated with a series of comorbidities, including dyslipidemia, arterial hypertension, diabetes mellitus and periodontitis [1,2]. Obesity and periodontitis share an inflammatory component in their pathophysiology. Periodontitis is a chronic multifactorial inflammatory disease associated with dysbiotic plaque biofilms and characterized by host-mediated inflammation that results in the progressive destruction of periodontal attachment [3]. The host cells' first defense strategy against periodontal pathogens is to release proinflammatory cytokines, which stimulates infiltration of polymorphonuclear leukocytes (PMNs). Prolonged inflammation as a response to bacterial plaque causes leukocytes to generate reactive oxygen species (ROS) such as hydrogen peroxide and superoxide. Together with disrupted antioxidant defenses, this leads to oxidative stress and apoptosis in the periodontal tissue [4,5], suggesting there are shared mechanisms in periodontitis and systemic inflammatory diseases. In fact, oxidative stress occurs in periodontal tissues, gingival crevicular fluid, saliva, serum and plasma [6]. In spite of this, very little research has centered on the production of ROS by PMNs under unstimulated conditions [7–9]. Mitochondria are the most important source of ROS in cells [10] and are essential for several cellular functions, including ATP production, intracellular Ca^{2+} regulation and cell survival. The overproduction of ROS can induce several maladaptive responses that stimulate mutagenesis and the inflammatory response. Diminished mitochondrial biogenesis, altered membrane potential, genetic factors and aging simultaneously contribute to mitochondrial dysfunction, which appears to be a central cause of insulin resistance and cardiovascular complications [11], though little is known about its role in periodontal disease.

There is a close interrelation among oxidative stress, mitochondrial dysfunction and inflammation, and all are key players in the pathogenesis of atherosclerosis [12]. Endothelial dysfunction, which leads to atherosclerosis, is initiated by the accumulation of leukocytes in the vessel wall and their eventual movement into the subendothelial space. This process is mediated by cell adhesion molecules on white blood and/or endothelial cells, whose expression is enhanced in these circumstances [13]. In this context, retinol-binding protein 4 (RBP4)—an adipokine primarily secreted by adipocytes and hepatocytes and involved in transporting retinol in blood—has been associated with endothelial dysfunction [14], cardiovascular disease [15] and periodontitis [16,17].

Epidemiological studies suggest that periodontitis plays a role in atherosclerotic cardiovascular diseases [18,19]. In fact, periodontitis and endothelial dysfunction have been shown to be closely connecting [20,21]. In line with this, we have shown in a previous study that the release of ROS from leukocytes is exacerbated in a proinflammatory state, thus contributing to oxidative stress and endothelial dysfunction in obesity and periodontitis [8,22]. Furthermore, we have demonstrated worse clinical outcomes in obese patients than in non-obese subjects after non-surgical periodontal treatment (at 3 months) [17], which is evidence of a negative effect of obesity on the response to periodontal treatment. In this sense, therapy for periodontitis in obese patients is likely to be more beneficial if there is weight loss, as it reduces levels of systemic proinflammatory cytokines [23,24]. However, the effect of periodontal treatment on ROS generation and on atherosclerotic markers in patients with periodontitis has received little attention by researchers [7,25,26]. Therefore, the primary objective of the current pilot study—which had a before-and-after design—was to explore the effect of non-surgical periodontal treatment on parameters of oxidative stress in leukocytes and leukocyte-endothelial cell interactions in an obese population with periodontitis. As a secondary aim, we set out to determine whether adjunctive dietary therapy can modulate these responses.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

This pilot study was conducted at University Hospital Dr. Peset (Valencia, Spain), from October 2018 to January 2020, and followed a before-and-after design. Obese patients were recruited from the

Department of Endocrinology and Nutrition and the Department of Odontology and met the following criteria: Age between 30 and 60 years old; obesity (body mass index (BMI) ≥ 30 kg/m², according to the criterion of the Spanish Society for the Study of Obesity (SEEDO)) [27] and periodontitis, interdental clinical attachment loss (CAL) detectable at ≥ 2 non-adjacent teeth, or buccal or oral CAL ≥ 3 mm with pocketing > 3 mm detectable at ≥ 2 teeth, according to the definition of the 2017 World Workshop [3]. The following exclusion criteria were established: fewer than fourteen teeth, inflammatory oral diseases (infectious or otherwise); periodontal treatment in the previous six months or antibiotics in the previous three months; current systemic anti-inflammatory treatment; pregnancy or lactation; severe disease (including malignancies and alcohol/drug abuse); psychiatric disorders, any medical condition requiring antibiotic treatment before the intervention and a history of cardiovascular disease, chronic inflammatory disease or diabetes mellitus (diagnosed using the criteria of the American Diabetes Association criteria).

This pilot study carried out in humans was conducted in line with the ethical principles stated in the Declaration of Helsinki. All procedures carried out were approved by the Ethics Committee of our hospital (protocol number 36/14). All those participating, including the umbilical-cord donors, gave their written informed consent.

2.2. Interventions

The entire study population underwent non-surgical periodontal treatment. Obese patients were randomized via the minimization method using OxMaR (Oxford Minimization and Randomization) software. This method is a dynamic randomization technique that has been widely used in clinical trials for achieving a balance of prognostic factors across treatment groups. In our case, sex, age and BMI were considered prognostic factors and resulted in the formation of two groups: half of the participants ($n = 26$) underwent dietary therapy during the week that the periodontal study and non-surgical periodontal treatment were performed, while the other half ($n = 26$) did not undergo dietary intervention until the experimental period had ended, thus constituting a control group of obese subjects who did not lose weight.

The same clinician that performed the periodontal determinations (M-H, M.) was responsible for administering the non-surgical periodontal treatment; namely, instructions for oral hygiene and a full-mouth mechanical periodontal debridement performed with an ultrasonic device (Suprasson Newtron, Satelec, Acteon, Merignac, France) and gracey manual curettes (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA). The full-mouth treatment (scaling and root planning) was performed in a single session, and the following adjunctive treatment was prescribed: use of a 0.12% chlorhexidine mouthwash (Bexident Encías[®], ISDIN S.A, Barcelona, Spain) for 60 s, twice per day, for 14 days [28], in the absence of local and/or systemic antibiotics.

Dietary therapy consisted of a VLCD (very low-calorie diet) followed for six weeks. The VLCD consisted of a liquid formula (Optisource Plus[®], Nestlé S.A., Vevey, Switzerland) with the following composition: 52.8 g protein, 75 g carbohydrates, 13.5 g fat and 11.4 g fibre, providing 654 kcal/day and all the essential vitamins, minerals and trace elements according to Recommended Dietary Allowances. After the six-week VLCD, subjects were assigned a low calorie diet for the following next six weeks: 50–55% carbohydrate, 28–33% fat and 15–20% protein, with an average daily energy intake of 1200–1800 kcal/day (recommended caloric requirements). Subjects were recommended to drink more than two liters of calorie-free liquids per day.

2.3. Determinations

All determinations were recorded at baseline and 12 weeks after intervention. In addition, we recorded data concerning medication patients were receiving at the time and smoking habit.

2.3.1. Clinical Periodontal Determinations

A full-mouth periodontal examination was performed to measure clinical attachment loss (CAL), probing depth (PD) and gingival bleeding on probing (BOP) at six sites per tooth for all teeth, excluding third molars. PD was measured from the gingival margin to the base of the clinical pocket; CAL was recorded as the distance from the cement–enamel junction to the base of the clinical pocket, and percentage of BOP was calculated by dividing the number of sites with BOP by the number of sites explored and multiplying this value by 100. The average CAL and PD were calculated for each participant, as was the percentage of sites with BOP. In addition to these periodontal parameters, we recorded the number of teeth with PD ≥ 4 mm and the percentage of sites with PD 1–3 mm, PD 4–5 mm and PD ≥ 6 mm. Periodontal assessment was carried out using a conventional manual periodontal probe model PCP UNC-15 (Hu-Friedy, Chicago, IL, USA).

2.3.2. Anthropometric and Biochemical Determinations

We calculated BMI by dividing the subject's weight in kilograms by the square of his/her height in meters (kg/m^2). With a metric tape, we measured waist circumference at the natural indentation between the 10th rib and the iliac crest. Blood pressure was recorded twice consecutively with an automatic sphygmomanometer (Omron M3, Kyoto, Japan). The formula $(\text{initial weight} - \text{final weight})/\text{initial weight} \times 100$ was employed to calculate percentage of weight loss after the diet.

Following 12-h overnight fasting, venous blood samples were collected, and glucose, total cholesterol (TC) and triglycerides (TG) were evaluated in serum by an enzymatic method using specific kits (Ref. 3L82-40, Ref. 7D62 and Ref. 7D74, respectively) from Abbott Diagnostics (Abbot Park, IL, USA). HDL levels were obtained with a Beckman LX20 analyzer (Beckman Corp., Brea, CA, USA) using a direct method (HDL with Ultra HDL Reagent Ref. 3K33 from Abbott Diagnostics, Abbot Park, IL, USA). The Friedewald formula was used to calculate LDL cholesterol (LDLc) when TG were below 300 mg/dL. Insulin levels were measured by immunoassay with Architect Insulin Reagent Kit (Ref. 8K41) from Abbott Diagnostics (Abbot Park, IL, USA) and insulin resistance was calculated using the Homeostasis Model of Assessment (HOMA-IR = $(\text{fasting insulin } (\mu\text{U}/\text{mL}) \times \text{fasting glucose } (\text{mg}/\text{dL})/405)$). High-sensitive C-reactive protein (hsCRP) levels were quantified by an immunonephelometric assay with high sensitivity c-reactive protein reagent (Ref. 474630) from Beckman Coulter (Brea, CA, USA), RBP4 systemic levels were assessed by means of nephelometry assay with a RBP-800 kit Ref. TD-42661 from Trimerio Diagnostics, (Barcelona, Spain), and serum levels of tumor necrosis factor alpha (TNF α) and P-selectin were determined with a Luminex[®] 200 analyzer system (Austin, TX, USA) using MILLIPLEX[®] MAP Human Cytokine/Chemokine and Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel kit, respectively (Millipore Corporation Billerica, MA, USA).

2.3.3. Cell Isolation

Leukocyte PMNs were isolated by incubating citrated blood samples with dextran 3% for 45 min at room temperature. The resulting supernatant was then dropped over Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) and centrifuged for 25 min at 650 g in order to isolate the PMNs and get rid of the remaining erythrocytes. After the pellet had been washed and suspended in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) (Capricorn, Ebsdorfergrund, Germany), cells were counted with a Scepter 2.0 cell counter (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

2.3.4. Evaluation of Oxidative Stress Parameters

With the objective of evaluating oxidative stress parameters, we employed a life cell imaging method. For fluorescence determinations, PMNs were seeded in a plate with 48-wells (1.5×10^5 cells/well) and incubated with different fluorescence probes diluted in HBSS for 30 min

at 37 °C. Nuclei were visualized using the specific nuclear stain Hoechst 33,342. Fluorescence was visualized with a fluorescence microscope (IX81 Olympus). CellR software (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan) was employed to capture individual images. The fluorescent signal was quantified individually (20 live cell images/well) by static cytometry software “ScanR” version 2.03.2 (Olympus, Shinjuku, Tokyo, Japan). Total ROS production was assessed with the 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) fluorochrome. Superoxide production by leukocytes was detected with dihydroethidium dye (DHE); levels of cytosolic Ca²⁺ were indicated by Fluo-4, and alterations in mitochondrial membrane potential were assessed using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM). All fluorescent probes were purchased from Life Technologies (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Antioxidant status was determined based on superoxide dismutase (SOD) activity in serum, as indicated by the manufacturer's instructions (Superoxide Dismutase Assay Kit, Cayman Chemical, MI, USA).

2.3.5. Adhesion Assay

A parallel plate flow chamber connected to an inverted microscope (Nikon Eclipse TE 2000-S) allowed us to measure leukocyte-endothelial cell interactions *in vitro*. Prior to this, we had collected human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) from fresh umbilical cords donated by healthy donors. These HUVEC were seeded on coverslips at 1×10^3 cells/mm². Cells were cultivated to confluence in complete EMB-2 culture medium (Lonza, Basel, Switzerland), after which the coverslips were placed in the bottom plate of a flow chamber. One million leukocytes in 1 mL of RPMI medium (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were drawn across the HUVEC at a flow rate of 0.36 mL/min. A video camera (Sony Exware HAD; Koeln, Germany) connected to the microscope permitted a 5×25 mm view of the endothelial cells, and different leukocyte parameters—rolling velocity, rolling flux and adhesion—were evaluated over a period of 5 min, as we have described previously [23].

Platelet-activating factor (1 μM, 1 h) and TNFα (10 ng/mL, 4 h) (Sigma Aldrich, MO, USA) were employed as positive controls for the activation of PMNs and HUVECs, respectively.

2.4. Statistical Analysis

Based on preliminary data [23], this study was designed to have a power of 80% and to detect differences of ≥ 5 cells/mm² between two paired means of the primary criterion of efficacy (minimum expected difference in leukocyte adhesion), assuming a common standard deviation of 7 units. Accordingly, 16 subjects were considered. Statistical analysis of the data was performed with SPSS 19.0 software (SPSS Statistics Inc., Chicago, IL, USA). Continuous variables in the tables were expressed as mean \pm standard deviation (SD) for parametric data, and non-parametric data were expressed as the median and 25th and 75th percentiles. The figures show the mean + standard error (SE). To evaluate changes after the intervention, we used a paired Student's *t*-test for parametric samples and a Wilcoxon test for non-parametric samples. Both groups of obese patients—one undergoing and the other not undergoing dietary therapy—were compared at baseline and at 12 weeks by means of an unpaired Student's *t*-test for parametric samples or a Mann–Whitney U-test for non-parametric samples. Qualitative data were expressed in percentages and proportions were compared with a Chi-square test. A confidence interval of 95% was applied to all the tests, and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

A total of 52 patients with grade II-III obesity (BMI ≥ 35 kg/m²) and periodontitis were recruited for the study, three of whom eventually dropped out (they did not return at 12 weeks). All the remaining 49 subjects (32 women and 17 men; mean age: 43.7 ± 8.5 years) underwent non-surgical periodontal treatment; 23 of these did not undergo dietary therapy and 26 underwent dietary weight loss intervention.

3.1. Clinical and Biochemical Parameters

Table 1 presents anthropometric and biochemical parameters. At baseline, no significant differences in age, sex, or anthropometric or metabolic/inflammatory variables were detected between the groups. After intervention, anthropometric parameters in the dietary therapy group—body weight, BMI, and waist circumference—were found to have decreased significantly ($p < 0.001$), whereas HDLc increased ($p = 0.025$). Blood pressure (systolic and diastolic), total cholesterol, LDLc, triglycerides and hydrocarbonated metabolism parameters (glucose, insulin and HOMA-IR) remained unchanged after weight loss. Of the total population, 30.6% of patients were taking antihypertensive drugs, and 22.4% were on antihyperlipidemic drugs, with no significant differences between groups ($p > 0.05$). A Chi-square test ($p = 0.566$) revealed no differences between the two groups of obese patients with regard to a smoking habit, with 77.6% of the participants proving to be non-smokers.

Table 1. Anthropometric parameters and biochemical variables in an obese population, some of which underwent adjunctive dietary therapy, at baseline and 12 weeks after non-surgical periodontal treatment.

	Obese without Diet		Obese with Diet		All Obese Subjects	
	Baseline	12 Weeks	Baseline	12 Weeks	Baseline	12 Weeks
n (% females)	23 (60.9)	—	26 (69.2)	—	49 (65.3)	—
Age	43.6 ± 7.8	—	43.8 ± 9.3	—	43.7 ± 8.5	—
Weight (kg)	118.6 ± 24.1	120.0 ± 24.9	125.5 ± 17.0	115.7 ± 16.3 ***	122.3 ± 20.7	117.7 ± 20.7 ***
Weight loss (%)	—	1.11 ± 3.10	—	-7.76 ± 4.66	—	-3.60 ± 5.98
BMI (kg/m ²)	42.3 ± 6.8	42.7 ± 6.8	44.6 ± 4.8	41.1 ± 4.7 ***	43.5 ± 5.9	41.9 ± 5.8 ***
Waist (cm)	122 ± 17	120 ± 16	125 ± 13	117 ± 14 ***	124 ± 15	119 ± 15 ***
SBP (mmHg)	137 ± 16	135 ± 16	134 ± 18	133 ± 16	135 ± 17	134 ± 16
DBP (mmHg)	85 ± 13	85 ± 11	84 ± 9	81 ± 11	85 ± 11	83 ± 11
Glucose(mg/dL)	95 ± 10	95 ± 12	97 ± 12	95 ± 13	96 ± 11	95 ± 13
Insulin (µU/mL)	18.4 ± 9.4	18.3 ± 7.1	15.7 ± 7.6	16.3 ± 9.2	17.0 ± 8.5	17.2 ± 8.3
HOMA-IR	4.49 ± 2.41	4.39 ± 1.81	3.84 ± 2.01	3.95 ± 2.61	4.13 ± 2.23	4.15 ± 2.27
TC (mg/dL)	179 ± 37	184 ± 42	181 ± 38	184 ± 46	180 ± 37	184 ± 44
HDLc (mg/dL)	42.4 ± 10.5	44.4 ± 12.5	40.9 ± 10.9	43.9 ± 12.0 *	41.6 ± 10.6	44.1 ± 12.1 *
LDLc (mg/dL)	111 ± 30	113 ± 33	114 ± 32	117 ± 39	113 ± 31	115 ± 36
TG (mg/dL)	137 (78, 172)	113 (101, 150)	112 (88, 152)	110 (88, 152)	121 (86, 167)	111 (91, 151)
hsCRP (mg/L)	4.41 (1.84, 7.69)	4.09 (1.93, 11.15)	6.06 (3.43, 9.85)	6.03 (3.99, 9.84)	5.59 (2.63, 8.46)	5.92 (3.34, 10.3)
RBP4 (mg/dL)	4.38 ± 0.99	3.95 ± 1.06 *	3.76 ± 1.10	3.35 ± 0.98 *	4.05 ± 1.09	3.63 ± 1.05 **
TNFα (pg/mL)	17.8 ± 3.1	16.5 ± 4.01	17.1 ± 6.2	13.0 ± 1.8 *	17.4 ± 5.2	14.4 ± 3.3 **

Data represent mean ± standard deviation for parametric data and median (25th and 75th percentiles) for non-parametric data. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when data of diet vs. no diet groups were compared at baseline and 12 weeks by a paired Student's *t*-test for parametric data or by a Wilcoxon test for non-parametric data. Abbreviations: BMI: body mass index, SBP: systolic blood pressure, DBP: diastolic blood pressure, HOMA-IR: homeostasis model assessment of insulin resistance, TC: total cholesterol, HDLc: HDL cholesterol, LDLc: LDL cholesterol, TG: triglycerides, hsCRP: high sensitive C-reactive protein, RBP4: retinol-binding protein 4, TNFα: tumor necrosis factor alpha.

Systemic inflammatory parameters were altered by intervention. Specifically, TNFα levels decreased after dietary therapy ($p = 0.029$), while RBP4 levels were reduced in both groups after periodontal treatment ($p = 0.043$ in obese subjects undergoing dietary therapy and $p = 0.014$ in obese subjects not following the diet). However, hsCRP levels did not change after 12 weeks of treatment.

Regarding periodontal disease, in the dietary weight loss intervention ($n = 26$), 13 were in stage I (initial periodontitis), 11 were in stage II (moderate periodontitis) and 2 were in stage III (severe periodontitis). Among those that did not follow a diet ($n = 23$), 10 were in stage I, 8 in stage II and 5 in stage III. There were no differences in clinical periodontal parameters between the groups at baseline, as well as, no differences were observed in the periodontal parameters between the groups 12 weeks after the intervention (Table 2). As we had expected, a significant improvement in all clinical periodontal parameters was observed across the whole study population after non-surgical periodontal treatment. However, no differences were observed between the two groups in terms of the changes observed in periodontal parameters 12 weeks after the intervention.

Table 2. Clinical periodontal parameters of obese subjects undergoing vs. not undergoing adjunctive dietary therapy at baseline and 12 weeks after non-surgical periodontal treatment.

	Obese without Diet (n = 23)			Obese with Diet (n = 26)			All Obese Subjects (n = 49)		
	Baseline	12 Weeks	Absolute Change	Baseline	12 Weeks	Absolute Change	p-Value Change	Baseline	12 Weeks
Mean PD (mm)	3.20 ± 0.52	3.02 ± 0.51 **	-0.18 ± 0.22	2.97 ± 0.43	2.79 ± 0.33 ***	-0.17 ± 0.16	0.884	3.07 ± 0.48	2.90 ± 0.44 ***
Mean CAL (mm)	3.26 ± 0.63	3.08 ± 0.61 **	-0.18 ± 0.20	2.97 ± 0.43	2.85 ± 0.36 **	-0.13 ± 0.22	0.443	3.10 ± 0.55	2.95 ± 0.50 ***
Teeth PD ≥4 mm (n)	19.6 ± 5.5	14.8 ± 5.9 **	-4.82 ± 6.01	18.2 ± 5.8	13.9 ± 6.16 ***	-4.38 ± 4.35	0.773	18.9 ± 5.6	14.3 ± 6.00 ***
Sites PD 1–3 mm (%)	63.5 ± 19.5	74.4 ± 21.5 **	10.8 ± 12.5	73.7 ± 15.9	82.5 ± 12.5 ***	8.76 ± 7.91	0.489	69.1 ± 18.2	78.8 ± 17.5 ***
Sites PD 4–5 mm (%)	32.3 ± 14.5	23.1 ± 17.7 **	-9.22 ± 12.53	24.6 ± 13.3	16.5 ± 10.3 ***	-8.11 ± 8.09	0.713	28.1 ± 14.3	19.5 ± 14.4 ***
Sites PD ≥6 mm (%)	4.13 ± 6.41	2.52 ± 4.41 *	-1.62 ± 2.92	1.68 ± 5.35	1.00 ± 3.07*	-0.68 ± 2.35	0.226	2.80 ± 5.92	1.69 ± 3.78 **
BOP (%)	29.1 ± 14.0	16.8 ± 10.6 ***	-12.3 ± 13.6	27.3 ± 14.6	17.0 ± 10.1 ***	-10.3 ± 10.9	0.573	28.1 ± 14.2	16.9 ± 10.2 ***

Data represented mean ± standard deviation * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ when data of diet vs. no diet groups were compared at baseline and 12 weeks using a paired Student's *t*-test. Obese without diet vs. obese with diet were compared at baseline and 12 weeks with an unpaired Student's *t*-test. Absolute changes of periodontal variables in obese patients with or without dietary therapy were compared by an unpaired Student's *t*-test.

3.2. Evaluation of Intracellular Leukocyte Parameters and Superoxide Dismutase Activity

ROS production, mitochondrial membrane potential and cytosolic Ca^{2+} in PMNs were determined by means of static cytometry. As a whole, after the intervention, we observed a significant decline in total superoxide production ($p = 0.001$) (Figure 1A) and lower levels of cytosolic Ca^{2+} ($p = 0.006$) (Figure 2A). In addition, these changes were observed independently of the diet as an adjuvant therapy (Figures 1B and 2B and representative images in Figures 1C and 2C, respectively).

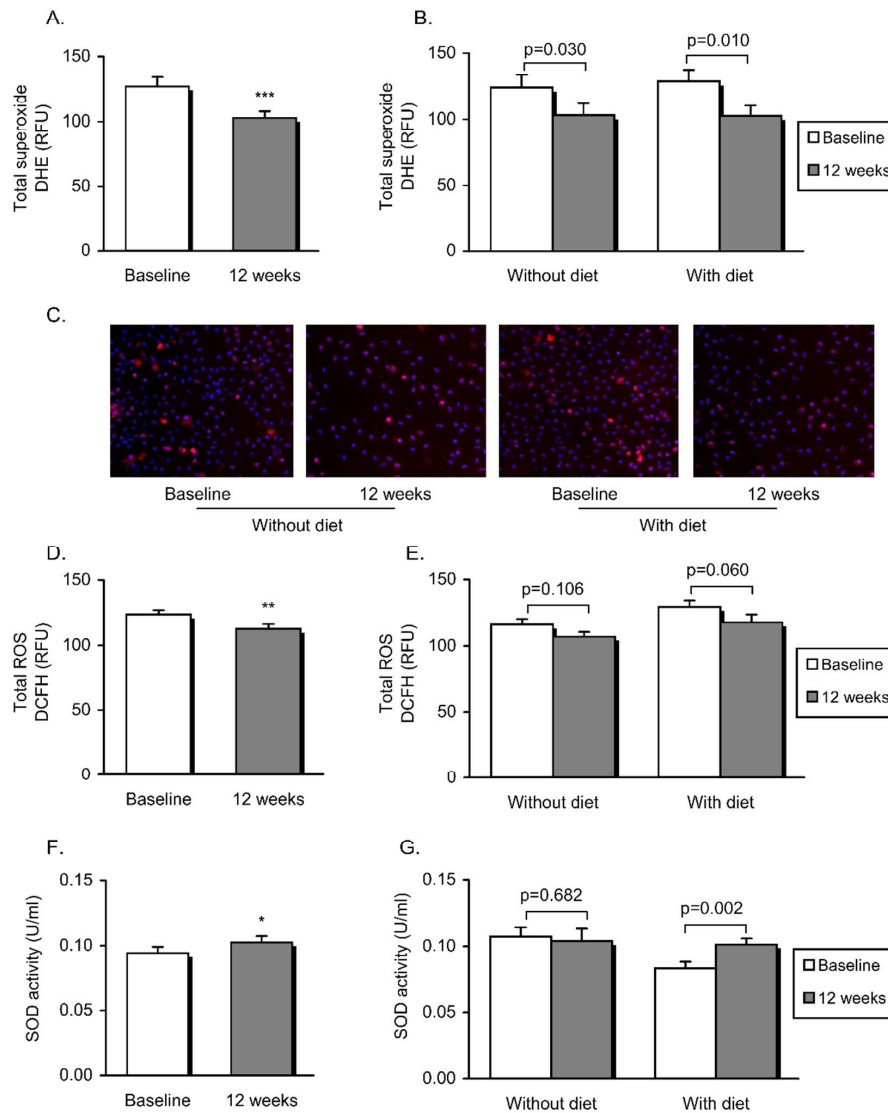


Figure 1. Parameters of oxidative stress in the study population before and after non-surgical periodontal treatment and dietary weight loss intervention. Total superoxide production was measured as arbitrary units of DHE fluorescence (A,B), and representative images depict DHE staining in red and Hoechst 33,342 nuclei fluorescence in blue (C). Total reactive oxygen species was calculated as the mean fluorescence intensity of DCFH (D,E). Superoxide dismutase activity in serum is also shown (F,G). Data are represented as mean + standard error. A paired Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$) was employed to compare the whole obese population before and after intervention. Obese patients undergoing vs. those not undergoing dietary therapy were compared before and after intervention using a paired Student's *t*-test (differences were considered significant when $p < 0.05$).

when the groups were considered separately, this response was found to be specific to patients that had undergone dietary therapy ($p = 0.019$) (Figure 3F) and was associated with decreased levels of P-selectin in serum (126.1 ± 53.1 vs. 108.06 ± 43.27 , $p = 0.018$). Neither PMN rolling velocity (Figure 3A,B) nor PMN rolling flux (Figure 3C,D) were altered twelve weeks after intervention.

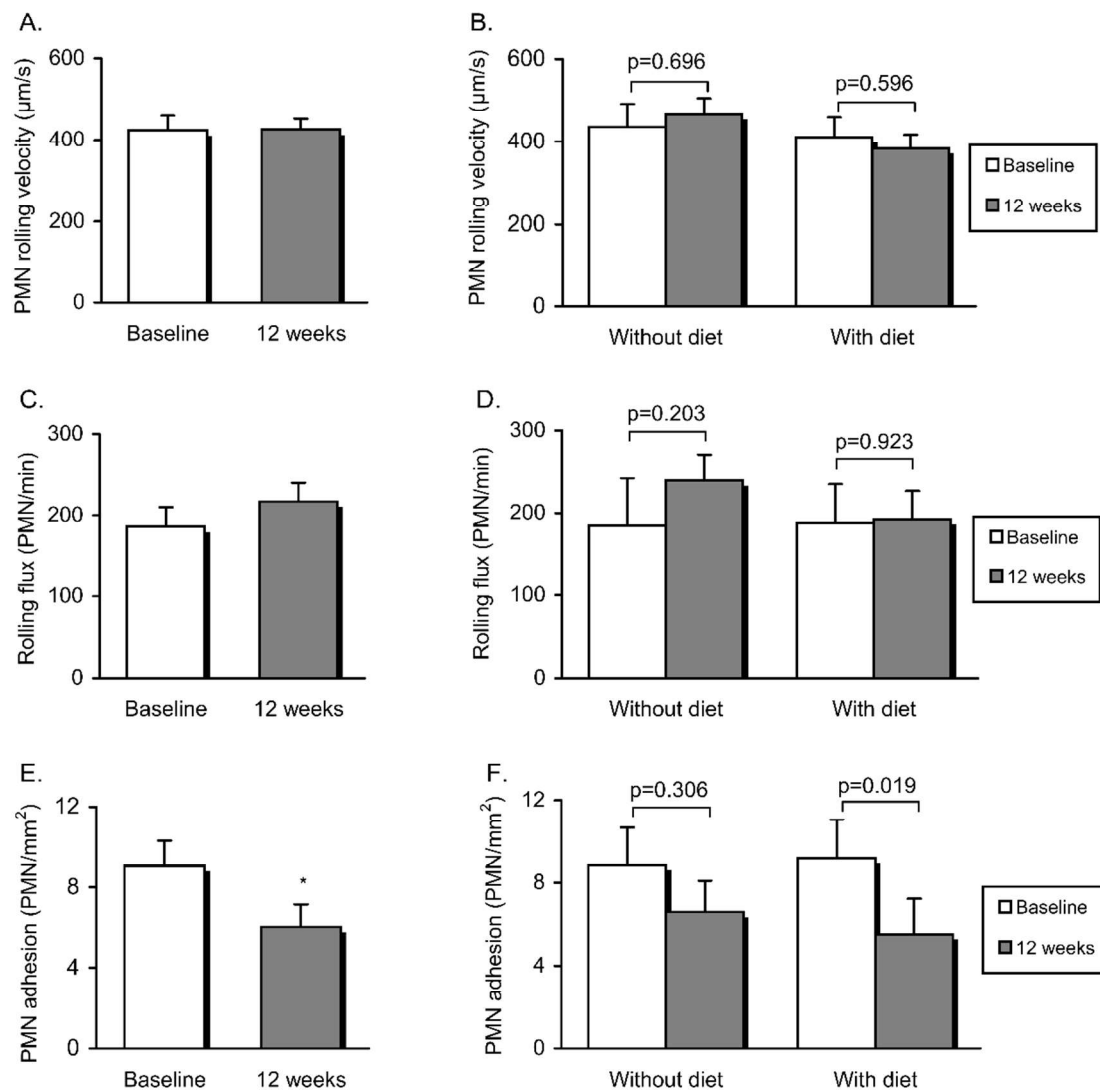


Figure 3. Endothelial function (determined by PMN-endothelial interactions) in the study population before and after non-surgical periodontal treatment and dietary weight loss intervention: PMN rolling velocity (A,B), PMN rolling flux (C,D) and PMN adhesion (E,F). Data are represented as mean + standard error. The whole obese population was compared before and after intervention using a paired Student’s *t*-test (* $p < 0.05$). Obese patients undergoing vs. those not undergoing dietary therapy were compared before and after intervention (also using a paired Student’s *t*-test; differences were considered significant when $p < 0.05$).

4. Discussion

In this pilot study, an obese population of middle-aged subjects with periodontitis underwent non-surgical periodontal treatment in conjunction with, or in the absence of, dietary weight loss intervention. All clinical periodontal parameters improved subtly but in a statistically significant manner in both groups after periodontal treatment, whether or not the dietary program had been followed, without differences being observed between the groups. In addition, RBP4, total superoxide and intracellular Ca^{2+} were reduced in the whole population, independently of weight loss, suggesting

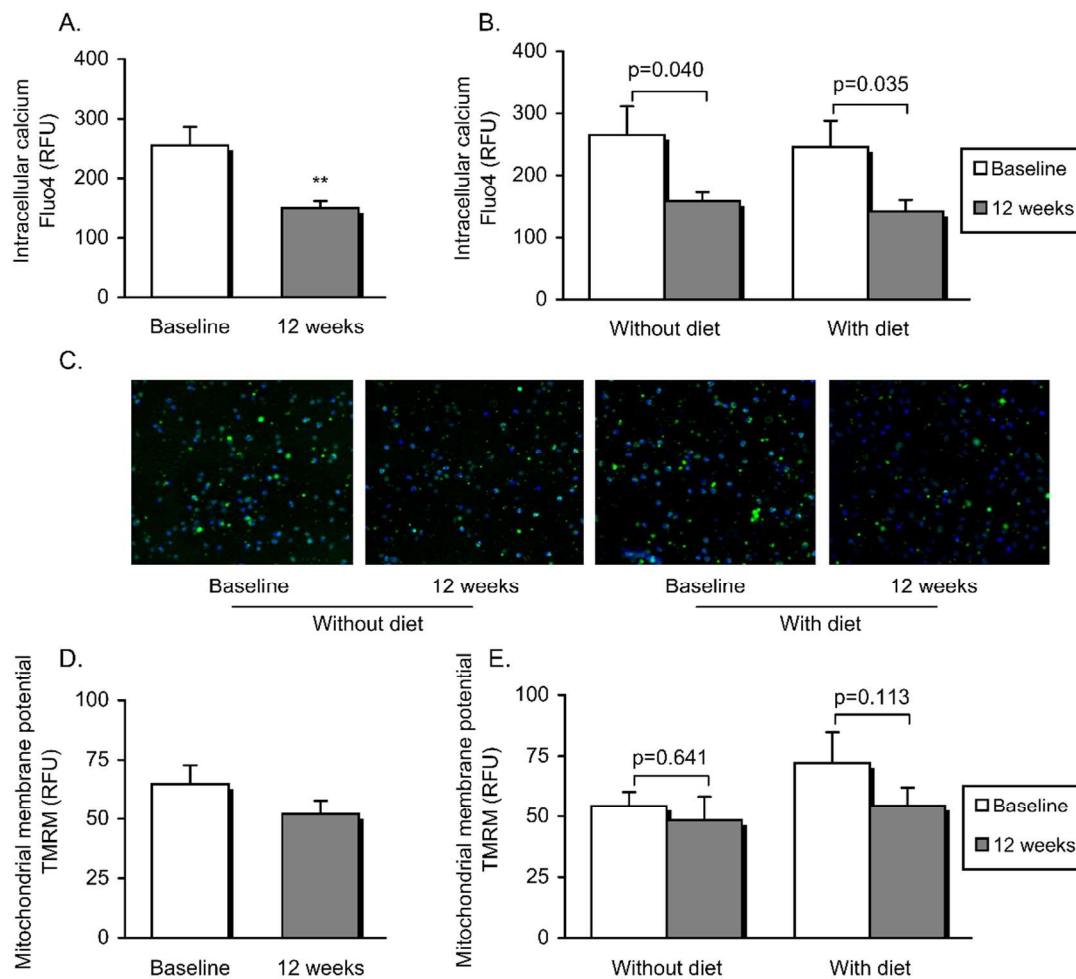


Figure 2. Mitochondrial function and cytosolic Ca^{2+} in patients' leukocytes prior to and following non-surgical periodontal treatment and dietary weight loss intervention. Intracellular calcium was calculated as arbitrary units of Fluo4 fluorescence (A,B). Fluorescence microscopy images of leukocytes labelled with Fluo4 (green) and Hoechst 33,342 (blue) for nuclei staining (C). Mitochondrial membrane potential was measured as the mean of fluorescence intensity of TMRM (D,E). Data are shown as mean + standard error. A paired Student's *t*-test (** $p < 0.01$) was used to compare the whole obese population before and after the intervention. Obese patients undergoing vs. those not undergoing dietary therapy were compared before and after intervention (also using a paired Student's *t*-test; differences were considered significant when $p < 0.05$).

Additionally, total ROS (Figure 1D) was significantly lower in PMNs from all subjects after intervention ($p = 0.010$). Although a downward trend was noted in both obese groups, the reduction did not prove to be significant when the two populations were clustered (Figure 1E). Furthermore, an increase in antioxidant defenses was manifested by significantly higher SOD activity in serum ($p = 0.040$), specifically after dietary weight loss intervention ($p = 0.002$) (Figure 1F,G). On the other hand, mitochondrial membrane potential was found to be unaltered twelve weeks after intervention, though there was a trend towards a decline in the patients who had undergone dietary therapy (Figure 2D,E).

3.3. Leukocyte-Endothelial Cell Interaction Assay

Finally, we investigated whether or not these changes—manifested mainly through leukocyte activation—were accompanied by an increase in adhesion under flow conditions, and to do this, we performed the assay under flow conditions. The results showed a statistically significant reduction in PMN adhesion in the whole population after intervention ($p = 0.018$) (Figure 3E). Nevertheless,

that non-surgical periodontal treatment by itself improves leukocyte homeostasis. However, among the subjects that had followed the diet, a systemic reduction in $\text{TNF}\alpha$ was observed, together with an increase in HDL cholesterol and in enzymatic antioxidant systems such as SOD activity. These latter responses were associated with fewer adherences of leukocytes to the endothelium, which represented a reduced cardiovascular risk in these patients.

Under normal physiological conditions, a dynamic equilibrium is maintained between ROS and antioxidant defenses. Oxidative stress occurs when this equilibrium shifts in favor of ROS and is thought to play a causative role in the pathogenesis of many systemic diseases, including obesity and periodontitis. In periodontitis, oxidative stress has been described mainly in gingival tissues, saliva and gingival crevicular fluid [20,29]. Leukocytes are the main mediators of inflammatory response and are a key player in the onset of atherosclerosis.

Elevated ROS levels are a result of inflammation induced by neutrophils as they fight invading bacteria and play both direct and indirect roles in the destruction of periodontal tissue [4,5]. This situation is exacerbated in obesity, since circulating mononuclear cells are already in a proinflammatory state [30]. In this context, we have recently published data showing that PMNs from obese patients with periodontitis are hyperactive and increase cytoplasmic production of superoxide, and that this is associated with an alteration in leukocyte-endothelium cell interactions [8]. Our present findings take things a step further by illustrating the influence of non-surgical periodontal treatment on the same population; namely, a reduction of cytoplasmic levels of total ROS and total superoxide after periodontal treatment, in line with previous studies of the effect of non-surgical periodontal treatment on neutrophils of patients with periodontitis. In the study by Matthews et al., extracellular ROS production was reduced after therapy [31], while more recently Ling et al. reported that neutrophils of patients with periodontitis released less superoxide following two months of non-surgical periodontal treatment [7]. In addition, a local or systemic reduction of oxidative stress parameters such as 8-hydroxy-deoxyguanosine [26], reactive oxygen metabolites [32], total oxidative status, malondialdehyde and SOD [33] has been reported after non-surgical periodontal treatment, while a significant increase in SOD activity has been observed in platelets [34]. SOD is the major antioxidant enzyme responsible for superoxide removal, and it plays a critical role as a primary antioxidant defense in tissue. However, the findings of research about periodontal status and its relationship with systemic SOD activity are contradictory. While some authors have found SOD activity to be decreased after non-surgical periodontal treatment [33], others have observed a compensatory increase to levels similar to those of healthy subjects. Our data show that serum SOD activity was increased after periodontal treatment specifically in the subjects that underwent adjunctive dietary therapy, suggesting that the effect was owing to said diet.

The endoplasmic reticulum (ER) is an intracellular Ca^{2+} store of inflammatory cells and a key regulator of cell function [35]. Accumulating evidence associates a rise in intracellular free Ca^{2+} concentration in neutrophils with increases in chemotaxis, ROS release and apoptosis. In this regard, mediators of oxidative stress, apoptosis and Ca^{2+} entry are higher in the leukocytes of patients with pathologies such as multiple sclerosis, ankylosing spondylitis or obesity, and treatment with compounds with anti-inflammatory properties or weight loss have been shown to modulate these responses [36–38]. Our present data demonstrate that non-surgical periodontal treatment reduces abnormal Ca^{2+} distribution and ROS (mainly total superoxide), which would suggest a recovery of cell homeostasis. Further investigation is needed to evaluate to what extent these changes are implicated in the pathophysiology of periodontitis. By contrast, mitochondrial membrane potential does not seem to be involved in the underlying mechanisms of periodontitis, since it is unaltered by the presence/absence/grade of the disease, as we have previously published [8]. Moreover, as shown in the present study, mitochondrial membrane potential is not affected by non-surgical periodontal treatment. The fact that we have observed a downward trend after dietary weight loss intervention suggests that weight loss is capable of modulating mitochondrial function, in line with a recent report published by our group [36].

Past clinical studies have found a specific relation between elevated serum RBP4 levels and cardiovascular disease [15,39,40]. In endothelial cells, RBP4 treatment undermines mitochondrial function and increases vascular oxidative stress by inducing mitochondrial superoxide production [41], in accordance with the reduction in systemic RBP4 levels and the restoration of leukocyte homeostasis (mainly total superoxide production) we have observed in the present study. In addition, leukocyte-endothelial cell adhesion induced by TNF α leads to an increased production of ROS by said cells [42,43], which promotes leukocyte transmigration to the subendothelial space. Although there is increasing evidence that periodontal treatment can improve endothelial function [44–47], as far as we know, there are no reports to date about its effect in an obese population. Previous randomized clinical trials have evaluated the effect of periodontal treatment on vasodilation and subclinical arterial thickness in patients with periodontitis in the presence or absence of comorbidities. In fact, Tonetti et al. showed an improvement in brachial artery flow-mediated dilation 6 months after therapy [44], in line with the observations of D'Aiuto et al. in a type 2 diabetic population [45], while Saffi et al. did not find changes in patients with coronary artery disease 3 months after therapy [46]. In addition, periodontal therapy was found to have reduced carotid intima-media thickness in an aboriginal Australian population 3 months after treatment [47].

The present findings show less leukocyte adhesion to the endothelium in patients that followed the dietary weight loss program, in whom systemic TNF α and P-selectin levels were also reduced. hsCRP remained unchanged after the experimental period, which is compatible with the findings of previous studies [44,48]. In some studies, non-surgical periodontal treatment has been linked to a decrease in systemic TNF α levels in a non-obese population [49], but we observed a significant reduction of TNF α only when non-surgical periodontal treatment was combined with weight loss, possibly due to the continuously high levels of synthesis of TNF α by adipocytes and macrophages in obese individuals [50]. However, in the present study, we did not observe a greater periodontal response in the obese group undergoing dietary weight loss intervention, as we did in a previous work [24]. This was probably due to differences at baseline in BMI, mean PD and percentage of sites with PD 4–5 mm between the groups, as well as the reduced sample size. In addition, although the non-surgical periodontal treatment produced a statistically significant improvement in all clinical periodontal parameters in both obese groups, these changes were subtle, and the subjects still presented several sites with residual pockets (PD \geq 4 mm) and bleeding on probing 12 weeks after therapy. This limited impact of periodontal therapy is in accordance with Lakkis et al.'s assessment of morbidly obese patients [51], suggesting that obesity is implicated in the impaired response to non-surgical periodontal treatment. In fact, we have previously reported [17] a smaller reduction in the number of teeth with PD \geq 4 mm three months after non-surgical periodontal treatment in an obese vs. a non-obese population. Therefore, the persistence of residual periodontal inflammation could be due to the presence of a high level of chronic subclinical inflammation in the morbidly obese population. Most of the participants in the present study had mild-moderate periodontitis, in which case a mechanical scaling and polishing would probably have been sufficient to treat those with periodontal pockets of 4 mm. However, due to the already existing systemic inflammation in the obese population, we performed a full-mouth scaling and root planning in all our patients in order to achieve a greater reduction of periodontal inflammation. In line with this, a previous randomized, controlled trial in patients with periodontitis and hyperlipidemia showed that two and six months after treatment, serum proinflammatory cytokine levels and triglyceride levels were significantly lower in the group that had undergone a full-mouth intensive scaling and root planning than in the group that had undergone a standard cycle of supragingival mechanical scaling and polishing [52]. In another randomized controlled trial in which patients with type 2 diabetes and periodontitis were randomly assigned to a treatment group (scaling and root planning) or a control group (supragingival removal of plaque and calculus using ultrasound), it was observed that periodontal treatment significantly improved periodontal and metabolic parameters, whereas no improvement was observed in the control group [53]. In order to confirm the relationship between weight loss, systemic inflammation, oxidative stress, endothelial dysfunction and periodontal therapy

outcomes, it is necessary to perform further longitudinal prospective studies and randomized controlled trials in larger patient samples with more severe periodontitis, with different degrees of BMI, and over longer periods of time. It is also important to assess different periodontal therapies (non-surgical periodontal treatment vs. standard buccal cleaning and polishing) and to incorporate a control group that does not undergo periodontal treatment and a group receiving only dietary therapy.

We should bear in mind certain limitations of the present study. The sample size was moderately small, though it was supported by sample size calculation, and the follow-up period was relatively short. Additionally, we did not include a control group without periodontal treatment, and the before-and-after experimental design is a type of non-experimental design that requires caution due to “threats to internal validity”. Regarding periodontal outcomes, we should mention that the non-surgical periodontal treatment we applied produced limited changes in periodontal parameters. We observed a persistence of sites with residual pockets and bleeding on probing, probably due to the mild periodontal status of our patients, which may have made the improvements produced by the therapy appear negligible. In terms of the methodology, the DHE fluorescence probe we employed to detect superoxide involves limitations that could have interfered with our findings; for example, nonspecific redox reactions may have confounded our DHE-superoxide determinations. Nevertheless, we should point out that our initial results were supported by the DCFH fluorescence probe we subsequently performed. Further research should explore a potential association between modifications in the intracellular signaling of leukocytes and their interaction with the endothelium. Moreover, the risk of subsequently developing atherosclerosis and cardiovascular disease requires further investigation.

5. Conclusions

To sum up, our results suggest that non-surgical periodontal treatment reduces total ROS (mainly superoxide) and promotes the recovery of cellular homeostasis in leukocytes of obese subjects, independently of whether there has been weight loss. When periodontal treatment is accompanied with dietary intervention, a reduction in systemic TNF α levels and an increase in SOD activity appear to mediate additional effects by which leukocyte-endothelium cell interactions and cardiovascular risk factors are reduced. Our data provide further knowledge about the pathogenesis of atherosclerosis and encourage the use of dietary therapy in conjunction with non-surgical periodontal treatment as a way of impeding the atherosclerotic process.

Author Contributions: Conceptualization, F.J.S., V.M.V. and M.R.; data curation, M.M.-H., V.M.V. and M.R.; formal analysis, M.M.-H., Z.A.-J., V.M.V. and M.R.; funding acquisition, V.M.V. and M.R.; investigation, M.M.-H., Z.A.-J., S.L.-D., J.S.-R. and C.F.M.-A.; methodology, M.M.-H., Z.A.-J., V.M.V. and M.R.; project administration, F.J.S., V.M.V. and M.R.; resources, F.J.S., V.M.V. and M.R.; supervision, F.J.S., V.M.V. and M.R.; visualization, M.M.-H. and Z.A.-J.; writing—original draft, M.M.-H. and M.R.; writing—review and editing, M.V.M. and M.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This study was supported by grants PI19/00437 and PI19/00838, FI17/00144 from Carlos III Health and has been co-funded by the European Regional Development Fund (ERDF “A way to build Europe”), FPU18/00854 from Ministry of Science, Innovation and Universities and PROMETEO/2019/027 from the Valencian Regional Ministry of Education, Culture and Sports. Unrestricted grant from Menarini S.A. No external funding, apart from the support of the authors’ institution, was available for this study.

Acknowledgments: The authors acknowledge the editorial assistance of Brian Normanly (CIBERehd) and technical assistance of Rosa Falcon (Ministry of Science, Innovation and Universities (PTA2017-14355-I)).

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

Abbreviations

DCFH	dichlorodihydrofluorescein
RFU	relative fluorescent units
DHE	dihydroethidium
SOD	superoxide dismutase
ROS	reactive oxygen species
TMRM	Tetramethylrhodamine methyl ester
PMN	polymorphonuclear leukocytes

References

- Frühbeck, G. Obesity: Screening for the evident in obesity. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2012**, *8*, 570–572. [[CrossRef](#)]
- Virto, L.; Cano, P.; Jiménez-Ortega, V.; Fernández-Mateos, P.; González, J.; Esquifino, A.I.; Sanz, M. Obesity and periodontitis: An experimental study to evaluate periodontal and systemic effects of comorbidity. *J. Periodontol.* **2018**, *89*, 176–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Tonetti, M.S.; Greenwell, H.; Kornman, K.S. 2017 WORLD WORKSHOP: Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45* (Suppl. 20), S149–S161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Chapple, I.L.; Matthews, J.B. The role of reactive oxygen and antioxidant species in periodontal tissue destruction. *Periodontol 2000* **2007**, *43*, 160–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Kanzaki, H.; Wada, S.; Narimiya, T.; Yamaguchi, Y.; Katsumata, Y.; Itohiya, K.; Fukaya, S.; Miyamoto, Y.; Nakamura, Y. Pathways that regulate ROS scavenging enzymes, and their role in defense against tissue destruction in periodontitis. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 351. [[CrossRef](#)]
- Wang, Y.; Andrukhov, O.; Rausch-Fan, X. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 910. [[CrossRef](#)]
- Ling, M.R.; Chapple, I.L.; Matthews, J.B. Neutrophil superoxide release and plasma C-reactive protein levels pre- and post-periodontal therapy. *J. Clin. Periodontol.* **2016**, *43*, 652–658. [[CrossRef](#)]
- Martinez-Herrera, M.; López-Domènech, S.; Silvestre, F.J.; Silvestre-Rangil, J.; Bañuls, C.; Victor, V.M.; Rocha, M. Chronic periodontitis impairs polymorphonuclear leucocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 1429–1439. [[CrossRef](#)]
- Matthews, J.B.; Wright, H.J.; Roberts, A.; Ling-Mountford, N.; Cooper, P.R.; Chapple, I.L. Neutrophil hyper-responsiveness in periodontitis. *J. Dent. Res.* **2007**, *86*, 718–722. [[CrossRef](#)]
- Murphy, M.P. How Mitochondria Produce Reactive Oxygen Species. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 1–13. [[CrossRef](#)]
- Kim, J.A.; Wei, Y.; Sowers, J.R. Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance. *Circ. Res.* **2008**, *102*, 401–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Yang, X.; Li, Y.; Li, Y.; Ren, X.; Zhang, X.; Hu, D.; Gao, Y.; Xing, Y.; Shang, H. Oxidative Stress-Mediated Atherosclerosis: Mechanisms and Therapies. *Front. Physiol.* **2017**, *8*, 600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Rocha, V.Z.; Libby, P. Obesity, inflammation, and atherosclerosis. *Nat. Rev. Cardiol.* **2009**, *6*, 399–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Park, S.E.; Kim, D.H.; Lee, J.H.; Park, J.S.; Kang, E.S.; Ahn, C.W.; Lee, H.C.; Cha, B.S. Retinol-binding protein-4 Is Associated With Endothelial Dysfunction in Adults With Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Mellitus. *Atherosclerosis* **2009**, *204*, 23–25. [[CrossRef](#)]
- Liu, Y.; Wang, D.; Chen, H.; Xia, M. Circulating retinol binding protein 4 is associated with coronary lesion severity of patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis* **2015**, *238*, 45–51. [[CrossRef](#)]
- Kanoriya, D.; Pradeep, A.R.; Mallika, A.; Singhal, S.; Garg, V. Correlation of crevicular fluid and serum levels of retinol-binding protein 4 and leptin in chronic periodontitis and obesity. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *21*, 2319–2325. [[CrossRef](#)]
- Martinez-Herrera, M.; Silvestre, F.J.; Silvestre-Rangil, J.; López-Domènech, S.; Bañuls, C.; Rocha, M. Levels of serum retinol-binding protein 4 before and after non-surgical periodontal treatment in lean and obese subjects: An interventional study. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 336–344. [[CrossRef](#)]
- Southerland, J.H.; Moss, K.; Taylor, G.W.; Beck, J.D.; Pankow, J.; Gangula, P.R.; Offenbacher, S. Periodontitis and diabetes associations with measures of atherosclerosis and CHD. *Atherosclerosis* **2012**, *222*, 196–201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Tonetti, M.S. Periodontitis and risk for atherosclerosis: An update on intervention trials. *J. Clin. Periodontol.* **2009**, *36* (Suppl. 10), 15–19. [[CrossRef](#)]
20. Moura, M.F.; Navarro, T.P.; Silva, T.A.; Cota, L.O.M.; Soares Dutra Oliveira, A.M.; Costa, F.O. Periodontitis and endothelial dysfunction: Periodontal clinical parameters and levels of salivary markers interleukin-1 β , tumor necrosis factor- α , matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of metalloproteinases-2 complex, and nitric oxide. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 778–787. [[CrossRef](#)]
21. Orlandi, M.; Suvan, J.; Petrie, A.; Donos, N.; Masi, S.; Hingorani, A.; Deanfield, J.; D’Aiuto, F. Association between periodontal disease and its treatment, flow-mediated dilatation and carotidintima-media thickness: A systematic review and meta-analysis. *Atherosclerosis* **2014**, *236*, 39–46. [[CrossRef](#)]
22. López-Domènech, S.; Bañuls, C.; Díaz-Morales, N.; Escribano-López, I.; Morillas, C.; Veses, S.; Orden, S.; Álvarez, Á.; Víctor, V.M.; Hernández-Mijares, A.; et al. Obesity impairs leukocyte-endothelium cell interactions and oxidative stress in humans. *Eur. J. Clin. Investig.* **2018**, *48*, e12985. [[CrossRef](#)]
23. López-Domènech, S.; Martínez-Herrera, M.; Abad-Jiménez, Z.; Morillas, C.; Escribano-López, I.; Díaz-Morales, N.; Bañuls, C.; Víctor, V.M.; Rocha, M. Dietary weight loss intervention improves subclinical atherosclerosis and oxidative stress markers in leukocytes of obese humans. *Int. J. Obes.* **2019**, *43*, 2200–2209. [[CrossRef](#)]
24. Martínez-Herrera, M.; López-Domènech, S.; Silvestre, F.J.; Silvestre-Rangil, J.; Bañuls, C.; Hernández-Mijares, A.; Rocha, M. Dietary therapy and non-surgical periodontal treatment in obese patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 1448–1457. [[CrossRef](#)]
25. Önder, C.; Kurgan, Ş.; Altıngöz, S.M.; Bağış, N.; Uyanık, M.; Serdar, M.A.; Kantarcı, A.; Günhan, M. Impact of non-surgical periodontal therapy on saliva and serum levels of markers of oxidative stress. *Clin. Oral Investig.* **2017**, *21*, 1961–1969. [[CrossRef](#)]
26. Öngöz Dede, F.; Bozkurt Doğan, Ş.; Ballı, U.; Avcı, B.; Durmuşlar, M.C. The effect of initial periodontal treatment on plasma, gingival crevicular fluid and salivary levels of 8-hydroxy-deoxyguanosine in obesity. *Arch. Oral Biol.* **2016**, *62*, 80–85. [[CrossRef](#)]
27. Salas-Salvadó, J.; Rubio, M.A.; Barbany, M.; Moreno, B. (Grupo Colaborativo de la SEEDO). SEEDO 2007: Consensus for the evaluation of overweight and obesity and the establishment of therapeutic intervention criteria. *Med. Clin. (Barc.)* **2007**, *128*, 184–196. [[CrossRef](#)]
28. da Costa, L.F.N.P.; Amaral, C.D.S.F.; Barbirato, D.D.S.; Leão, A.T.T.; Fogacci, M.F. Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *J. Am. Dent. Assoc.* **2017**, *148*, 308–318. [[CrossRef](#)]
29. Ramesh, K.S.V.; Swetha, P.; Mohan Kumar, P.; Sruthima, N.V.S.; Naresh Kumar, C. Estimation of superoxide dismutase levels in saliva and gingival crevicular fluid among smokers and non-smokers in periodontitis patients-An Observational Study. *Niger. Med. J.* **2019**, *60*, 133–137. [[CrossRef](#)]
30. Ghanim, H.; Aljada, A.; Hofmeyer, D.; Syed, T.; Mohanty, P.; Dandona, P. Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state. *Circulation* **2004**, *110*, 1564–1571. [[CrossRef](#)]
31. Matthews, J.B.; Wright, H.J.; Roberts, A.; Cooper, P.R.; Chapple, I.L. Hyperactivity and reactivity of peripheral blood neutrophils in chronic periodontitis. *Clin. Exp. Immunol.* **2007**, *147*, 255–264. [[CrossRef](#)]
32. Tamaki, N.; Tomofuji, T.; Ekuni, D.; Yamanaka, R.; Yamamoto, T.; Morita, M. Short-term effects of non-surgical periodontal treatment on plasma level of reactive oxygen metabolites in patients with chronic periodontitis. *J. Periodontol.* **2009**, *80*, 901–906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Wei, D.; Zhang, X.L.; Wang, Y.Z.; Yang, C.X.; Chen, G. Lipid peroxidation levels, total oxidant status and superoxide dismutase in serum, saliva and gingival crevicular fluid in chronic periodontitis patients before and after periodontal therapy. *Aust. Dent. J.* **2010**, *55*, 70–78. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Siqueira, M.A.; Fischer, R.G.; Pereira, N.R.; Martins, M.A.; Moss, M.B.; Mendes-Ribeiro, A.C.; Figueredo, C.M.; Brunini, T.M. Effects of non-surgical periodontal treatment on the L-arginine-nitric oxide pathway and oxidative status in platelets. *Exp. Biol. Med. (Maywood N.J.)* **2013**, *238*, 713–722. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ruiz, A.; Matute, C.; Alberdi, E. Intracellular Ca²⁺ release through ryanodine receptors contributes to AMPA receptor-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress in oligodendrocytes. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e54. [[CrossRef](#)]
36. López-Domènech, S.; Abad-Jiménez, Z.; Iannantuoni, F.; de Marañón, A.M.; Rovira-Llopis, S.; Morillas, C.; Bañuls, C.; Víctor, V.M.; Rocha, M. Moderate weight loss attenuates chronic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human obesity. *Mol. Metab.* **2019**, *19*, 24–33. [[CrossRef](#)]

37. Naziroglu, M.; Kutluhan, S.; Ovey, I.S.; Aykur, M.; Yurekli, V.A. Modulation of oxidative stress, apoptosis, and calcium entry in leukocytes of patients with multiple sclerosis by *Hypericum perforatum*. *Nutr. Neurosci.* **2014**, *17*, 214–221. [[CrossRef](#)]
38. Ugan, Y.; Naziroğlu, M.; Şahin, M.; Aykur, M. Anti-tumor Necrosis Factor Alpha (Infliximab) Attenuates Apoptosis, Oxidative Stress, and Calcium Ion Entry Through Modulation of Cation Channels in Neutrophils of Patients with Ankylosing Spondylitis. *J. Membr. Biol.* **2016**, *249*, 437–447. [[CrossRef](#)]
39. Dessein, P.H.; Tsang, L.; Norton, G.R.; Woodiwiss, A.J.; Solomon, A. Retinol Binding Protein 4 Concentrations Relate to Enhanced Atherosclerosis in Obese Patients with Rheumatoid Arthritis. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e92739. [[CrossRef](#)]
40. Sun, Q.; Kiernan, U.A.; Shi, L.; Phillips, D.A.; Kahn, B.B.; Hu, F.B.; Manson, J.E.; Albert, C.M.; Rexrode, K.M. Plasma retinol-binding protein 4 (RBP4) levels and risk of coronary heart disease: A prospective analysis among women in the nurses' health study. *Circulation* **2013**, *127*, 1938–1947. [[CrossRef](#)]
41. Wang, J.; Chen, H.; Liu, Y.; Zhou, W.; Sun, R.; Xia, M. Retinol binding protein 4 induces mitochondrial dysfunction and vascular oxidative damage. *Atherosclerosis* **2015**, *240*, 335–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Ríos-Navarro, C.; de Pablo, C.; Collado-Díaz, V.; Orden, S.; Blas-García, A.; Martínez-Cuesta, M.Á.; Esplugaes, J.V.; Alvarez, A. Differential effects of anti-TNF- α and anti-IL-12/23 agents on human leukocyte-endothelial cell interactions. *Eur. J. Pharmacol.* **2015**, *765*, 355–365. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Yan, S.; Zhang, X.; Zheng, H.; Hu, D.; Zhang, Y.; Guan, Q.; Liu, L.; Ding, Q.; Li, Y. Clemastin inhibits VCAM-1 and ICAM-1 expression in TNF- α -treated endothelial cells via NADPH oxidase-dependent I κ B kinase/NF- κ B pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2015**, *78*, 190–201. [[CrossRef](#)]
44. Tonetti, M.S.; D'Aiuto, F.; Nibali, L.; Donald, A.; Storry, C.; Parkar, M.; Suvan, J.; Hingorani, A.D.; Vallance, P.; Deanfield, J. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 911–920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. D'Aiuto, F.; Gkranias, N.; Bhowruth, D.; Khan, T.; Orlandi, M.; Suvan, J.; Masi, S.; Tsakos, G.; Hurel, S.; Hingorani, A.D.; et al. Systemic Effects of Periodontitis Treatment in Patients With Type 2 Diabetes: A 12 Month, Single-Centre, Investigator-Masked, Randomised Trial. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **2018**, *6*, 954–965. [[CrossRef](#)]
46. Saffi, M.A.L.; Rabelo-Silva, E.R.; Polanczyk, C.A.; Furtado, M.V.; Montenegro, M.M.; Ribeiro, I.W.J.; Kampits, C.; Rösing, C.K.; Haas, A.N. Periodontal Therapy and Endothelial Function in Coronary Artery Disease: A Randomized Controlled Trial. *Oral Dis.* **2018**, *24*, 1349–1357. [[CrossRef](#)]
47. Kapellas, K.; Maple-Brown, L.J.; Jamieson, L.M.; Do, L.G.; O'Dea, K.; Brown, A.; Cai, T.Y.; Anstey, N.M.; Sullivan, D.R.; Wang, H.; et al. Effect of Periodontal Therapy on Arterial Structure and Function Among Aboriginal Australians: A Randomized, Controlled Trial. *Hypertension* **2014**, *64*, 702–708. [[CrossRef](#)]
48. Altay, U.; Gürkan, C.A.; Ağbaht, K. Changes in inflammatory and metabolic parameters after periodontal treatment in patients with and without obesity. *J. Periodontol.* **2013**, *84*, 13–23. [[CrossRef](#)]
49. Türer, Ç.C.; Durmuş, D.; Ballı, U.; Güven, B. Effect of Non-Surgical Periodontal Treatment on Gingival Crevicular Fluid and Serum Endocan, Vascular Endothelial Growth Factor-A, and Tumor Necrosis Factor-Alpha Levels. *J. Periodontol.* **2017**, *88*, 493–501. [[CrossRef](#)]
50. Olefsky, J.M.; Glass, C.K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu. Rev. Physiol.* **2010**, *72*, 219–246. [[CrossRef](#)]
51. Lakkis, D.; Bissada, N.F.; Saber, A.; Khaitan, L.; Palomo, L.; Narendran, S.; Al-Zahrani, M.S. Response to periodontal therapy in patients who had weight loss after bariatric surgery and obese counterparts: A pilot study. *J. Periodontol.* **2012**, *83*, 684–689. [[CrossRef](#)]
52. Fu, Y.W.; Li, X.X.; Xu, H.Z.; Gong, Y.Q.; Yang, Y. Effects of Periodontal Therapy on Serum Lipid Profile and Proinflammatory Cytokines in Patients with Hyperlipidemia: A Randomized Controlled Trial. *Clin. Oral Investig.* **2016**, *20*, 1263–1269. [[CrossRef](#)]
53. Mauri-Obradors, E.; Merlos, A.; Estrugo-Devesa, A.; Jané-Salas, E.; López-López, J.; Viñas, M. Benefits of Non-Surgical Periodontal Treatment in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus and Chronic Periodontitis: A Randomized Controlled Trial. *J. Clin. Periodontol.* **2018**, *45*, 345–353. [[CrossRef](#)]



