

Efecto del raspaje y alisado radicular a campo cerrado en pacientes hipertensos sobre niveles séricos de la IL 1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 P70, IL-17A, VEGF y TNF- α

Mariella Del Hierro Rada

Odontóloga, Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador. Especialista en Periodoncia Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Práctica privada:

mariella-delhierro@javeriana.edu.co

María José Sáenz Martínez

Odontóloga, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Especialista en Periodoncia Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Práctica privada:

mjsaenz@javeriana.edu.co

Federico José Hernández Meza

Odontólogo, Universidad Veritas. San José, Costa Rica. Especialista en Periodoncia Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. Práctica privada:

federicohernandez@javeriana.edu.co

Francina Escobar Arregocés

Odontóloga, Universidad de Cartagena, Colombia. Especialista en Periodoncia. Magister en Educiación. Docente, Facultad de Odontología de Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Juliana Velosa Porras

Odontóloga. Magister en Epidemiología Clínica. Profesora asistente, Facultad de Odontología, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Catalina Latorre Uriza

Odontóloga, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia Especialista en Periodoncia. Magister en Educiación. Docente, Facultad de Odontología de Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.

Resumen

Antecedentes: La literatura científica ha corroborado la relación que hay entre la hipertensión y la enfermedad periodontal. La terapia periodontal no quirúrgica, como el raspaje y alisado radicular a campo cerrado, puede tener un efecto sobre marcadores sistémicos de la inflamación.

Objetivo: Evaluar el efecto del raspaje y alisado radicular a campo cerrado sobre los niveles séricos de biomarcadores de inflamación en pacientes hipertensos.

Materiales y métodos: La muestra fue de 19 pacientes hipertensos, con diagnóstico periodontal Periodontitis Estadio II, III y IV, Grado A y B. Se les realizaron exámenes de laboratorio que incluían: glicemia, colesterol (LDL, HDL), triglicéridos y cuadro hemático completo. Se les realizó la toma de tensión arterial antes de iniciar la terapia periodontal y en la cita de reevaluación se tomó el segundo registro de tensión arterial. La cuantificación de las citocinas de sangre periférica se realizó mediante el kit Milliplex Inflammation Human Cytokine.

Resultados: Todos los niveles de citocinas medidas en los pacientes de la muestra disminuyeron del examen inicial a la reevaluación. La IL-1 β tuvo un valor inicial de 0.53 pg/ml, la IL-4 de 2.98 pg/ml, IL-6 de 0.31 pg/ml, IL-8 de 9.17 pg/ml, la IL-10 de 1.15 pg/ml, IL-12P70 de 1.82 pg/ml, IL-17A de 3.8 pg/ml, TNF α de 15.84 pg/ml y el VEGF de 152.10 pg/ml. Las medidas luego del tratamiento periodontal fueron: IL-1 β de 0.30 pg/ml, IL-4 de 1.23 pg/ml, IL-6 de 0.24 pg/ml, IL-8 de 7.79 pg/ml, IL-10 de 0.86 pg/ml, IL-12P70 de 0.94 pg/ml, IL-17A de 3.19 pg/ml, TNF α de 14.29 pg/ml y VEGF de 101.55 pg/ml. Las citocinas que reflejaron una diferencia estadísticamente significativa fueron la IL-1B y VEGF (p=0.04 y p=0.004).

Conclusiones: Los pacientes hipertensos con periodontitis sometidos a tratamiento periodontal no quirúrgico presentaron una disminución en los niveles de citocinas pro inflamatorias evaluadas, aunque las únicas que presentaron una diferencia estadísticamente significativa fue la VEGF y la IL-1 β .

Palabras clave: Enfermedad periodontal, tratamiento periodontal, marcadores inflamatorios, hipertensión, citocinas.

Abstract:

Background: The scientific literature has corroborated the relationship between hypertension and periodontal disease. Nonsurgical periodontal therapy, such as scaling and root planning, can have an effect on systemic markers of inflammation.

Objective: To evaluate the effect of scaling and root planning on serum levels of biomarkers of inflammation in hypertensive patients.

Materials and methods: The sample consisted of 19 hypertensive patients, with periodontal diagnosis Periodontitis Stage II, III and IV, Grade A and B. They underwent laboratory tests that included: glycemia, cholesterol (LDL, HDL), triglycerides and blood count full. The blood pressure was taken before starting periodontal therapy and the second blood pressure record was taken at the reevaluation appointment. Quantification of peripheral blood cytokines was performed using the Milliplex Inflammation Human Cytokine kit.

Results: All cytokine levels measured in the sample patients decreased from the initial examination to reassessment. The IL-1 β had an initial value of 0.53 pg / ml, the IL-4 of 2.98 pg / ml, IL-6 of 0.31 pg / ml, IL-8 of 9.17 pg / ml, the IL-10 of 1.15 pg / ml, IL-12P70 of 1.82 pg / ml, IL-17A of 3.8 pg / ml, TNF α of 15.84 pg / ml and VEGF of 152.10 pg / ml. The measures after periodontal treatment were: IL-1 β of 0.30 pg / ml, IL-4 of 1.23 pg / ml, IL-6 of 0.24 pg / ml, IL-8 of 7.79 pg / ml, IL-10 of 0.86 pg / ml, 0.94 pg / ml IL-12P70, 3.19 pg / ml IL-17A, 14.29 pg / ml TNF α and 101.55 pg / ml VEGF. The cytokines that reflected a statistically significant difference were IL-1B and VEGF (p = 0.04 and p = 0.004).

Conclusions: The hypertensive patients with periodontitis undergoing non-surgical periodontal treatment presented a decrease in the levels of pro-inflammatory cytokines evaluated, although the only ones that presented a statistically significant difference were VEGF and IL-1 β .

Keywords: Periodontal disease, periodontal treatment, inflammatory markers, hypertension, cytokines.

Introducción

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica constituye un grupo de patologías inflamatorias crónicas que incluyen: enfermedades del músculo cardíaco y del sistema vascular cardíaco, cerebral y otros órganos vitales. Eventos cerebrovasculares, como la enfermedad coronaria cardíaca o derrame cerebral son considerados una de las mayores causas de muerte en el mundo al año. Entre sus factores de riesgo se encuentran: la hipercolesterolemia, hipertensión arterial, el fumado y diabetes. (1–3). La disfunción endotelial refleja un fenotipo vascular propenso a la aterogénesis y, por lo tanto, puede servir como un marcador de riesgo de aterosclerosis inherente en un individuo. (4) Es decir, la disfunción endotelial es el paso inicial del desarrollo de la aterosclerosis, llevando a la enfermedad cardiovascular: como la hipertensión arterial. (5)

La hipertensión es una enfermedad crónica, que afecta 1.4 billones de personas en el mundo. (6) De acuerdo a la Guía de Prevención, Detección, Evaluación y tratamiento de la Presión arterial alta en Adultos del American College of Cardiology (ACC) y la American Heart Association (AHA), se clasifica como presión arterial normal a la presión sistólica <120 y diastólica <80 mmHg; presión arterial elevada: sistólica de 120-129 y diastólica <80 mmHg; grado 1: 130-139 o 80-89 mmHg y grado 2: ≥ 140 o ≥ 90 mmHg. (7). La hipertensión está asociada con la inflamación crónica en los tejidos y órganos implicados en la regulación de la presión arterial como los riñones y los vasos sanguíneos. La inflamación vascular puede contribuir a la alteración de funciones como la resistencia y rigidez endotelial. (9-10)

La enfermedad periodontal es una patología multifactorial, cuyo principal factor etiológico es el acúmulo de biopelícula. Esta enfermedad, afecta el tejido gingival y posteriormente, destruye el tejido de inserción y de soporte de los dientes. (10) Tiene una prevalencia del 20-50%, posicionándose en el sexto lugar de las condiciones inflamatorias más comunes. (6) El tejido gingival en condiciones de salud expresa moléculas de adhesión y neutrófilos que migran a través del epitelio de unión hacia el surco gingival. La barrera epitelial (compuesta por el epitelio gingival, surcular y de unión) previenen la invasión bacteriana a los tejidos periodontales. Cuando hay un incremento del desafío bacteriano, estos componentes y sus productos de desecho penetran hacia el tejido conectivo induciendo un aumento en la expresión de moléculas de adhesión y de productos pro inflamatorios. (11)

La bolsa periodontal proporciona un acceso para que las sustancias bacterianas invadan el tejido y activen células epiteliales que expresan IL-8 y células endoteliales que elevan la expresión de las moléculas de adhesión y causan aumento de la migración de linfocitos, edema y formación de infiltrado celular inflamatorio: monocitos, linfocitos T (CD8+ y CD4+), linfocitos B y neutrófilos. (11) Las citocinas producidas por estas células conducen a la diferenciación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos creando una respuesta humoral, que tienen varias funciones como: inducir inflamación, daño del tejido y amplificación de la respuesta inmune específica. (11)

En la literatura, se ha demostrado que existe una relación entre la inflamación y disfunción endotelial. Una de las causas de esta relación, es a través de la disminución de óxido nítrico (NO), que sugiere que la inflamación sistémica, podría de cierta forma, ser un factor etiológico de la disfunción endotelial. Ambas enfermedades son crónicas, silenciosas y tienen vías de asociación como: la inflamación, infección oral, estrés oxidativo, disfunción endotelial y factores de riesgo compartidos, tales como: tabaquismo, estrés, edad y factores socioeconómicos. (10)

Dependiendo de la severidad de la periodontitis, podría tener un efecto sobre marcadores sistémicos de la inflamación, tales como proteína C reactiva (CRP), fibrinógeno, TNF- α e interleucina 6 (IL-6), que llevarían a una disfunción endotelial, inestabilidad de la placa aterosclerótica, dislipidemia y resistencia a la insulina. Estas condiciones pueden llevar, a su vez, a un aumento de la presión arterial e incrementar el riesgo de mortalidad en pacientes hipertensos. (12)

Recientes hallazgos permiten proponer que la enfermedad periodontal, puede generar efectos sistémicos y de esta forma promover la aterogénesis por dos vías principales:

1. Vía directa: a través del paso de las bacterias periodontopatógenas por medio de ulceraciones en mucosa oral producidas por enfermedad periodontal (conocido como bacteremia)
2. Vía indirecta: La segunda vía plausible o vía indirecta se genera por el aumento de citocinas proinflamatorias en circulación sistémica. (10)

Algunos agentes infecciosos han sido identificados en los vasos sanguíneos adyacentes a la placa ateromatosa, se ha identificado ADN bacteriano de múltiples microorganismos periodontopatógenos, incluso se ha logrado demostrar la presencia de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* en placa ateromatosa. (9,10) En diferentes estudios se ha descrito que la enfermedad periodontal se asocia con una mayor aterosclerosis subclínica. Hay evidencia de una dilatación mediada por flujo deteriorada, que se podría restablecer mediante el tratamiento periodontal en personas que sufren de dicha enfermedad. (13)

Esta inflamación, genera una respuesta inmune que puede contribuir a la patogénesis de la aterosclerosis por el incremento de mediadores inmuno-inflamatorios y la activación de las metaloproteinasas en el tejido conectivo. (9) La eliminación de la carga infecciosa e inflamatoria de la enfermedad periodontal a través de la terapia periodontal podría estar asociada con una mejor función endotelial y estaría acompañada de una disminución de los niveles de los marcadores inflamatorios. También se ha observado que la terapia periodontal aumenta la producción de óxido nítrico, mejorando la función endotelial. (14)

Teniendo en cuenta estos antecedentes, surge la pregunta de investigación: ¿Cuál es el efecto del raspaje y alisado radicular a campo cerrado sobre los niveles séricos de IL 1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 P70, IL-17A, VEGF y TNF- α en pacientes con periodontitis estadio II, III y IV generalizada e hipertensión arterial? Por lo que el objetivo de este estudio fue analizar si el tratamiento periodontal no quirúrgico mejora la respuesta inflamatoria sistémica por medio de la medición de biomarcadores de inflamación como IL 1- β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 P70, IL-17A, VEGF y TNF- α y la importancia que esto significa para el manejo interdisciplinario de pacientes hipertensos en el control de la hipertensión arterial.

Materiales y métodos

Diseño de la Investigación:

Se realizó un estudio observacional de antes y después en el cual se evaluaron los cambios en los biomarcadores de inflamación sistémica, antes y después del tratamiento periodontal.

Muestra: Se tomaron 19 pacientes mayores de 30 años, con periodontitis estadio II, III y IV Grado A y B e hipertensión arterial controlada.

Criterios de inclusión: pacientes hipertensos diagnosticados y en tratamiento farmacológico, con mínimo 6 dientes presentes en cavidad oral y cuyo diagnóstico periodontal fuese: Periodontitis Estadio II, III y IV, Grado A y B.

Criterios exclusión: Pacientes diabéticos, fumadores, pacientes que hubiesen tomado antibióticos en los últimos 3 meses y que hubieran recibido tratamiento periodontal en los últimos 6 meses. Enfermedades inmunológicas que alteren los niveles de tensión arterial, como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico.

Procedimiento:

Previo aval del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana (CIEFOUJ), se explicó el estudio a los pacientes y a quienes cumplían los criterios de inclusión se les pidió que firmaran el Consentimiento Informado establecido para realizar la investigación. Una vez firmado el consentimiento, se realizó un examen periodontal inicial tomando en cuenta: presencia de sangrado gingival, nivel de inserción clínica y profundidad de sondaje.

La evaluación periodontal fue realizada por operadores calibrados, quienes usaron una sonda manual graduada tipo Carolina del Norte y se realizó un control de biopelícula medido con índice de O'Leary. El examen periodontal se realizó en seis puntos alrededor de cada diente presente en boca. Referenciando como surco o bolsa periodontal la medida desde el margen gingival hasta el fondo del surco o bolsa. Se tomó como surco normal las mediciones hasta 3mm y como bolsa periodontal de 4mm en adelante. La medición del margen gingival se tomó desde la unión amelocementaria hasta el margen gingival. Con estos datos de profundidad de surco y margen se calcularon los niveles de inserción y se emitió el diagnóstico periodontal con base en la clasificación del Workshop de 2017 y Armitage 1999 (17, 27).

Posterior al examen periodontal, se realizó la toma de exámenes de laboratorio, los cuales incluyeron cuadro hemático, perfil lipídico (triglicéridos, colesterol total HDL-LDL) y niveles séricos de los marcadores inflamatorios IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12P70, IL-17A, VEGF y TNF α . Los exámenes de laboratorio se realizaron en el Hospital Universitario San Ignacio a primera hora de la mañana y en ayunas. Luego de desayunar y descansar por una hora, se realizó la toma de la tensión arterial por personal calibrado en el departamento de cardiología del Hospital Universitario San Ignacio.

Todos los pacientes recibieron instrucción en higiene oral y tratamiento de raspaje y alisado radicular a campo cerrado con ultrasonido y curetas de Gracey en una sola sesión. En un promedio entre 4 -5 semanas luego del tratamiento periodontal se realizó una reevaluación, en donde se verificó el estado periodontal de los pacientes, tomando los mismos valores de referencia de la cita de valoración inicial. En la misma sesión se tomó cuadro hemático, glicemia, colesterol total, triglicéridos, cHDL, cLDL y biomarcadores de inflamación sistémica, además de la presión arterial, de igual manera que en la valoración inicial.

Procesamiento de muestras

Se tomaron tres tubos de sangre, dos tubos secos y uno con anticoagulante. La muestra obtenida en el tubo con anticoagulante EDTA fue procesada en el laboratorio clínico del Hospital Universitario San Ignacio para analizar cuadro hemático y glicemia. De igual manera, uno de los tubos secos se utilizó para analizar colesterol total, triglicéridos, cHDL y cLDL. Al otro tubo seco se le colocó un gel para separar el plasma y el suero, se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos y se congeló a -20 °C en el Hospital Universitario San Ignacio hasta su uso. Estas muestras se utilizaron para medir las citocinas, las cuales fueron medidas en el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO), al finalizar la recolección de las muestras.

Medición de Niveles séricos de los marcadores inflamatorios:

La cuantificación de las citocinas en suero, se realizó mediante el sistema de Luminex con el kit Milliplex Inflammation Human Cytokine. Este kit es capaz de realizar una variedad de bioensayos que incluyen inmunoensayos en la superficie de perlas magnéticas codificadas fluorescentes conocidas como microesferas MagPlex TM-C. Junto con la plataforma Luminex xMAP® con un formato de perlas magnéticas, se obtiene la ventaja de mayor velocidad y sensibilidad ideal, lo que permite la detección cuantitativa de múltiples analitos simultáneamente.

Este kit detecta mínimo 3.2 pg/ml de cada citocina a analizar. En caso de que exista una concentración de citocinas menor a esta cifra, el sistema dará un resultado equivalente a cero.

El ensayo se realizó en una placa donde se prepararon los reactivos y estándares de trabajo siguiendo las instrucciones del fabricante. La placa fue prelavada colocando 200 µl de buffer de lavado en cada pozo, luego se agitó a 700 rpm por 10 minutos, se volteó y se secó con una toalla de papel. Se prepararon las perlas para cada citoquina a evaluar y se colocaron en un solo recipiente (contenido de 3000 µl), se agitó cada recipiente donde se contenían las perlas en vortex por 1 minuto y se colocó 60 µl de agente reconstituyente de perlas por cada citocina. Se añadió 25 µL de estándar a los pozos correspondientes, 25 µl de buffer de ensayo a los pozos, 25µl de matriz de suero en los pozos de background, standards y controles y 25µl de suero a los pozos de muestra. Se colocó en vortex la botella con las perlas premezcladas y se añadió 25 µl a cada pozo, se selló con papel adhesivo y se envolvió con papel aluminio. Se agitó a 700 rpm, a 4 grados por 16 horas. Pasado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados con una placa magnética, se agregaron 25 µl de anticuerpos de detección y se agitó por 1 hora a temperatura ambiente. Luego se agregó 25 µL de Streptavidina-Phycoerytrina a cada pozo, se selló, se cubrió con aluminio y se agitó a temperatura ambiente por 30 minutos. Posterior a esto, se repitió el procedimiento de lavado y se agregó 150 µl de drive fluid y se resuspendieron las micropartículas (perlas) en el agitador por 5 minutos. Todas las muestras fueron montadas por duplicado.

Por último, se corrió la placa en el software Magpix Luminex 200. El equipo dio distintos valores dentro de los que encontramos el conteo total de perlas capturadas, intensidad media de fluorescencia y las concentraciones de las citocinas de interés, las cuales fueron determinadas de acuerdo con la curva estándar y expresadas en pg/ml, valor ajustado al factor de dilución.

Protocolo para toma de tensión arterial.

Para establecer la cifra de presión arterial se tomaron las medidas en ambos brazos con un intervalo de por lo menos dos minutos.

El paciente debía cumplir con los siguientes requisitos para una toma adecuada.

1. Estar sentado con la espalda apoyada y los brazos a la altura del corazón
2. La toma de presión arterial debía hacerse después de 5 minutos de reposo

3. El paciente no debía haber fumado ni consumido cafeína, en los 30 minutos previos a la toma de la tensión arterial
4. No hablar durante la medición
5. Soportar el brazo discretamente flejado con la palma de la mano hacia arriba, de preferencia en el brazo derecho o en el brazo dominante

Análisis estadístico:

- Se hizo descripción de las características demográficas y de los resultados de la evaluación periodontal y los biomarcadores sistémicos de inflamación mediante medias, medianas, rangos, desviaciones estándar e Intervalos de Confianza de 95%.
- Se consideraron en las comparaciones entre grupos, pruebas T de student o Chi-cuadrado, según fue apropiado. Se consideró como significativa una diferencia con valor de $p < 0.05$ (dos colas).

Resultados

El estudio incluyó un total de 22 pacientes de los cuales 3 fueron excluidos por seguimiento incompleto. De la muestra final el 52.6% eran mujeres (10 pacientes) y el 47.3% hombres (9 pacientes). Con un promedio de edad de 57.6 años (D.E. 2.2) (Tabla 1).

	#	%
Sexo		
F	10	52.6
M	9	47.3
Total	19	
	Media	D.E.
Edad	57.68	2.20

De los 19 pacientes incluidos en el estudio, el estado periodontal, de acuerdo con la clasificación del Workshop de 2017 al inicio del estudio y al momento de la reevaluación, 2 pacientes fueron diagnosticados con Periodontitis Estadio III Grado A, 10 con Periodontitis Estadio III Grado B, 2 con Periodontitis Estadio IV Grado A y 5 con Periodontitis Estadio IV Grado B. Con respecto a la clasificación de Armitage de 1999, al inicio del tratamiento, 17 pacientes presentaban una Periodontitis Crónica Severa Generalizada y 2 con Periodontitis Crónica Moderada Generalizada. Al momento de la reevaluación 4 presentaron Periodontitis Crónica Moderada Generalizada, 8 Periodontitis Crónica Severa Generalizada, 2 Periodontitis Crónica Moderada Localizada y 5 presentaron Periodontitis Crónica Severa Localizada. (Tabla 2).

	Pretratamiento		Postratamiento	
	#	%	#	%
Periodontitis estadio III grado A	2	10.53	2	10.53
Periodontitis estadio III grado B	10	52.63	10	52.63
Periodontitis estadio IV grado A	2	10.53	2	10.53
Periodontitis estadio IV grado B	5	26.32	5	26.32
Total	19	100	19	100

Se evaluaron un total de 464 dientes de los cuales 265 tuvieron bolsa periodontal a la evaluación inicial. El rango de las mismas fue de 4 mm a 14 mm, pretratamiento. Al mes de la reevaluación, el número de dientes fue de 462, por dos exodoncias realizadas en la fase higiénica y los dientes con bolsa periodontal fueron 175. El rango de las bolsas periodontales en la reevaluación fue de 4 mm a 12 mm. Al realizar la evaluación de los parámetros clínicos medidos, al inicio del estudio el promedio de dientes con periodontitis fue de 12.89, la profundidad de bolsa de 3.17 milímetros, el nivel de inserción clínica de 3.38 milímetros, el índice de sangrado de 58.43% y el índice de biopelícula de 41.36%. Al momento de la reevaluación se observaron los siguientes cambios: en cuanto al promedio de dientes con periodontitis fue de 8.84, la profundidad de bolsa de 2.89 mm, el nivel de inserción clínica de 3.15 mm, el índice de sangrado de 39.75 % e índice de biopelícula de 28.80 %. Lo que indica una disminución en todos los parámetros evaluados. (Tabla 3 y Gráfico 1).

	Pretratamiento		Postratamiento		Promedio de diferencia	IC 95%	P
	Media	Desviación	Media	D.E.			
Dientes con periodontitis	12.89	1.13	8.84	1.11	4.05	2.85	0.00
Profundidad de bolsa (mm)	3.17	0.12	2.89	0.10	0.28	0.21	0.00
NIC (mm)	3.38	0.27	3.15	0.29	0.23	0.049	0.01
Sangrado (%)	58.43	4.38	39.75	3.20	18.67	10.55	0.0001
Biopelícula (%)	41.36	2.23	28.80	2.08	12.55	6.55	0.0004

*NIC= Nivel de inserción clínica.

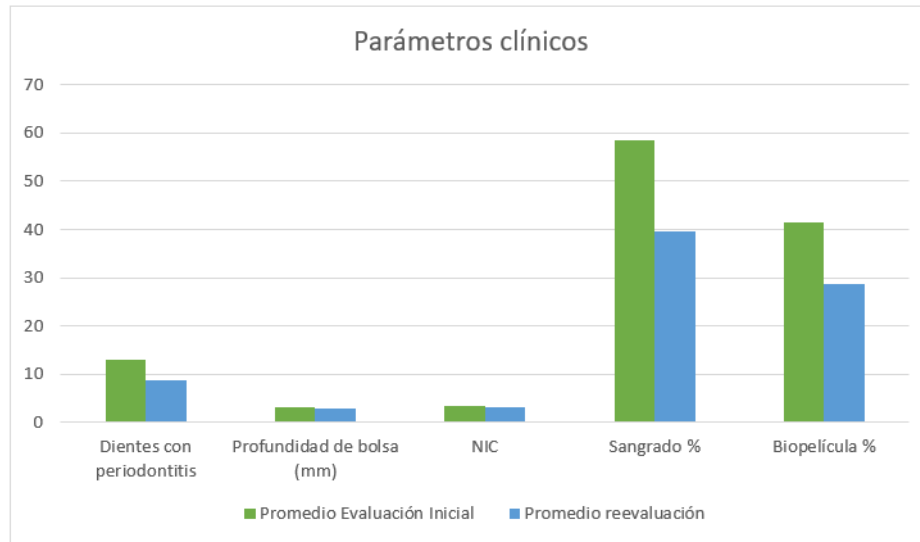


Gráfico 1: Promedios de parámetros clínicos periodontales iniciales y finales.

La cifra de tensión arterial al inicio del estudio tuvo una media de 135.15/86.1 mmHg y varió al final del tratamiento a un promedio de 133.26/83.15 mmHg, que no fue estadísticamente significativo. (Tabla 4).

	Pre tratamiento		Pos tratamiento		Promedio de diferencia	IC 95%	P
	Media	Desviación	Media	D.E.			
Sistólica	135.15	3.69	133.26	2.47	1.89	-5.89	0.61
Diastólica	86.10	1.80	83.15	1.14	2.94	-0.45	0.08

En los exámenes de laboratorio clínico se observó que la glicemia tuvo un aumento de 0.26 mg/dl al momento de la reevaluación. El colesterol, los triglicéridos, el HDL y el LDL se redujeron en 10.6 mg/dl, en 16.2 mg/dl, 38.6 mg/dl y el LDL 8.3 mg/dl respectivamente. Con una p estadísticamente significativa para el nivel de Triglicéridos y HDL. (Tabla 5 y Gráfico 2).

Tabla 5 Resultados exámenes de laboratorio (mg/dl)							
	Pretratamiento		Postratamiento		Promedio de diferencia	IC 95%	P
	Media	Desviación	Media	D.E.			
Glicemia	100.78	2.23	101.05	2.19	-0.26	-5.30	0.91
Colesterol	201.05	8.28	190.45	8.34	10.6	-0.51	0.06
Triglicéridos	176.38	18.08	160.14	17.62	16.24	0.33	0.04
HDL	83.71	10.53	45.05	2.70	38.65	17.27	0.001
LDL	124.23	6.88	115.89	4.87	8.33	-2.87	0.13

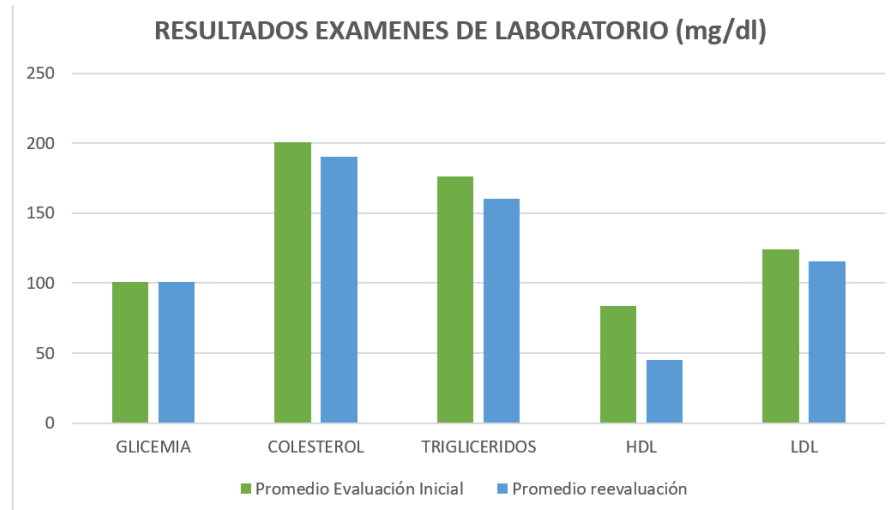


Gráfico 2: Promedio inicial y final de parámetros de exámenes de laboratorio (mg/dl).

Los niveles de citocinas evaluadas en los pacientes de la muestra disminuyeron del examen inicial a la reevaluación. La IL-1 β tuvo un valor inicial de 0.53 pg/ml, la IL-4 de 2.98 pg/ml, IL-6 de 0.31 pg/ml, IL-8 de 9.17 pg/ml, la IL-10 de 1.15 pg/ml, IL-12P70 de 1.82 pg/ml, IL-17A de 3.8 pg/ml, TNF α de 15.84 pg/ml y el VEGF de 152.10 pg/ml. Las medidas luego del tratamiento periodontal fueron: IL-1 β de 0.30 pg/ml, IL-4 de 1.23 pg/ml, IL-6 de 0.24 pg/ml, IL-8 de 7.79 pg/ml, IL-10 de 0.86 pg/ml, IL-12P70 de 0.94 pg/ml, IL-17A de 3.19 pg/ml, TNF α de 14.29 pg/ml y VEGF de 101.55 pg/ml. Las citocinas que reflejaron una diferencia estadísticamente significativa fueron la IL-1B y VEGF ($p=0.04$ y $p=0.004$) cuando fueron evaluadas con la prueba de Wilcoxon. (Tabla 6 y gráficos 3-12). Al establecer con base en la literatura un punto de corte para cada citoquina de acuerdo con los valores de referencia se encontró que en caso de IL-1B, IL-6, IL-8, IL-10, los niveles de estas citocinas fueron normales según su punto de corte tanto en los valores iniciales como finales de tratamiento. En caso del Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), a la evaluación inicial solo 2 pacientes presentaron valores normales y 17 presentaron valores aumentados, sin

embargo, en la evaluación final en cuanto a los niveles de esta citoquina, 3 pacientes presentaron valores normales y 16 valores aumentados según su punto de corte, con una $p=0.018^*$. (Tabla 7)

Tabla 6								
Niveles de citocinas (pg/ml)								
	Pre tratamiento		Pos tratamiento					
	Media	D.E	Media	D.E.	Promedio de diferencia	IC 95%	Valor p*	Valor p**
IL-1B	0.53	0.14	0.30	0.07	0.22	-0.09	0.14	0.04
IL-4	2.98	1.62	1.23	1.03	1.75	-0.78	0.16	0.27
IL-6	0.31	0.18	0.24	0.13	0.07	-0.05	0.22	0.30
IL-8	9.17	1.05	7.79	0.62	1.37	-0.74	0.19	0.22
IL-10	1.15	0.43	0.86	0.26	0.29	-0.50	0.44	0.42
IL-12P70	1.82	1.08	0.94	0.48	0.87	-0.49	0.19	0.36
IL-17A	3.8	1.08	3.19	0.69	0.60	-0.47	0.25	0.74
TNFα	15.84	1.06	14.29	1.05	1.54	-0.38	0.11	0.18
VEGF	152.10	28.70	101.55	18.36	50.55	16.56	0.05	0.004

*Prueba t -student; ** Prueba Wilcoxon

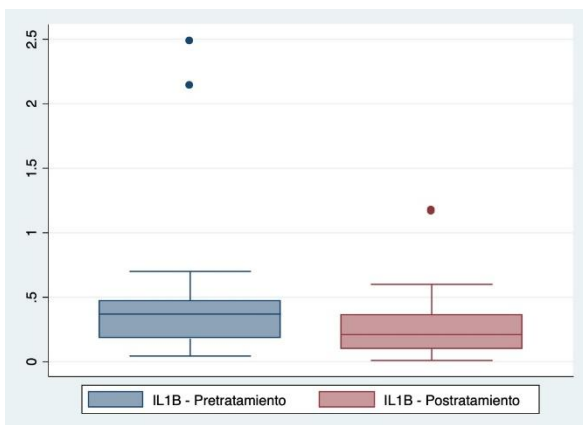


Gráfico 3: IL-1 β antes y después del tratamiento

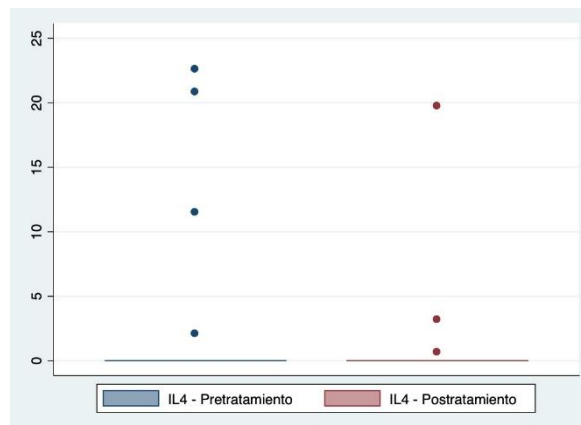


Gráfico 4: IL-4 antes y después del tratamiento

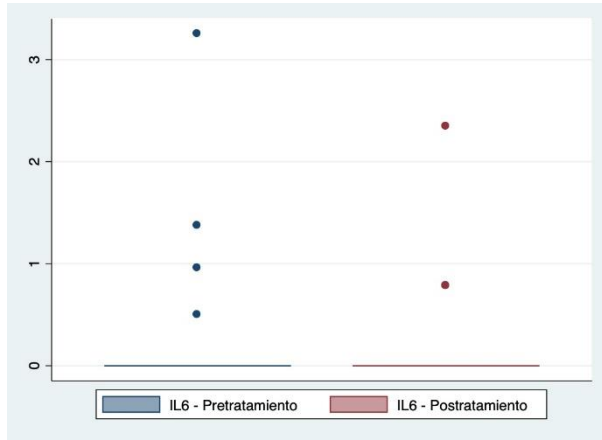


Gráfico 5: IL-6 antes y después del tratamiento

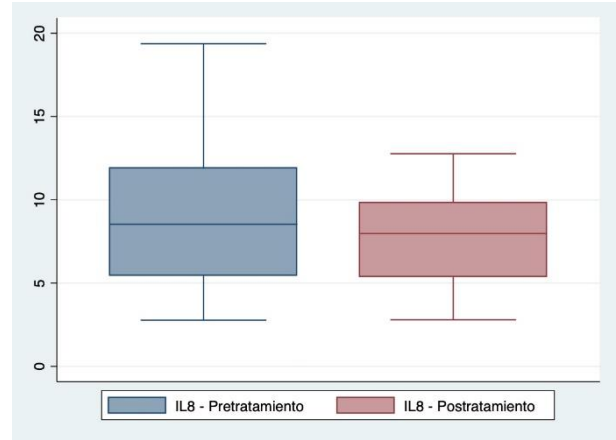


Gráfico 6: IL-8 antes y después del tratamiento

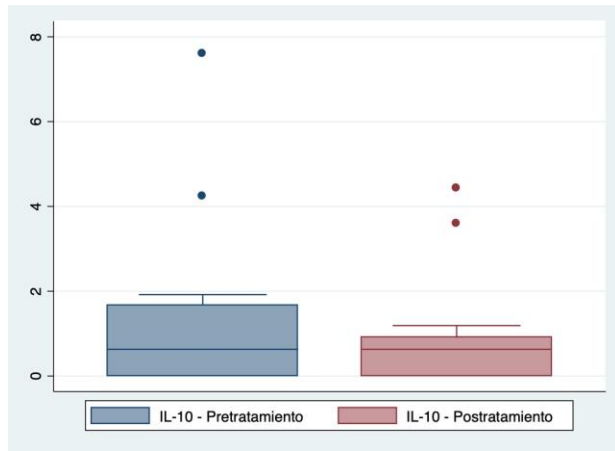


Gráfico 7: IL-10 antes y después del tratamiento

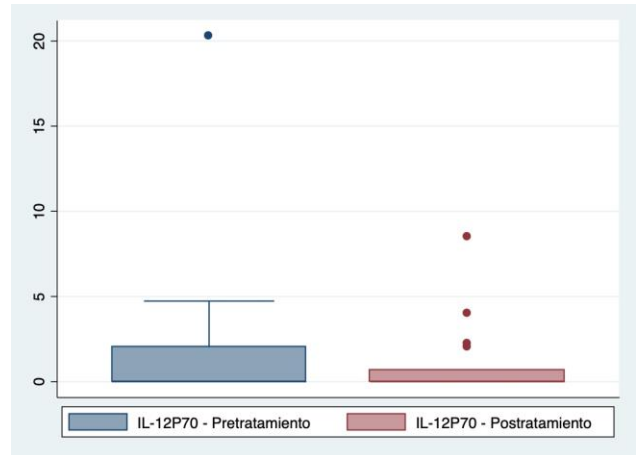


Gráfico 8: IL-12P70 antes y después del tratamiento

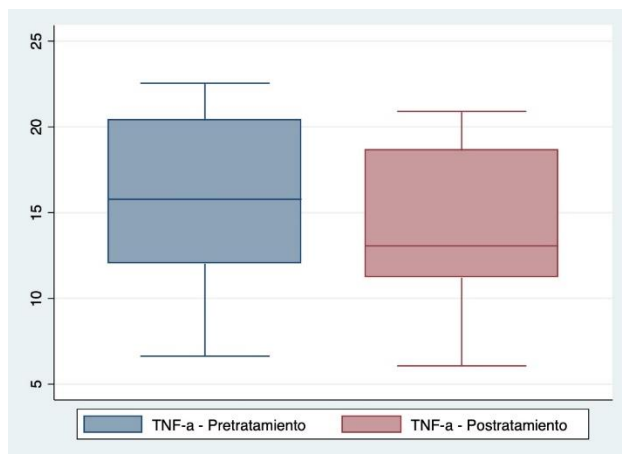


Gráfico 9: TNF- α antes y después del tratamiento

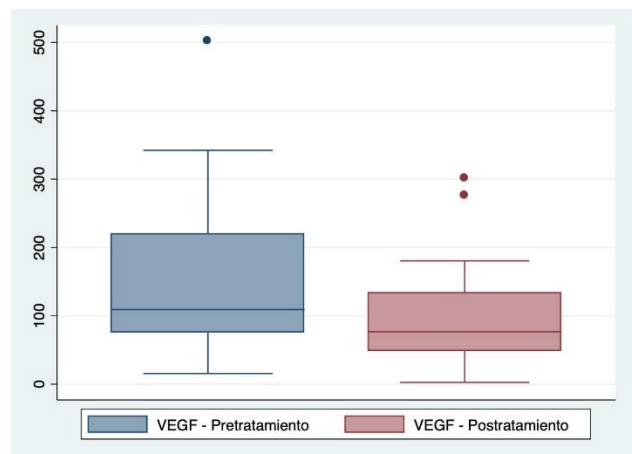


Gráfico 10: VEGF antes y después del tratamiento

Tabla 7 Análisis de citocinas según su punto de corte				
	Punto de corte pg/ml	Pretratamiento	Postratamiento	P
IL- 10	≤9.1	19	19	No calculable
	>9.1	0	0	
IL- 1B	≤5	19	19	No calculable
	>5	0	0	
IL- 6	≤3.4	18	19	No calculable
	>3.4	1	0	
IL-8	≤50	19	19	No calculable
	>50	0	0	
TNF α	≤8.1	2	3	0.018*
	>8,1	17	16	

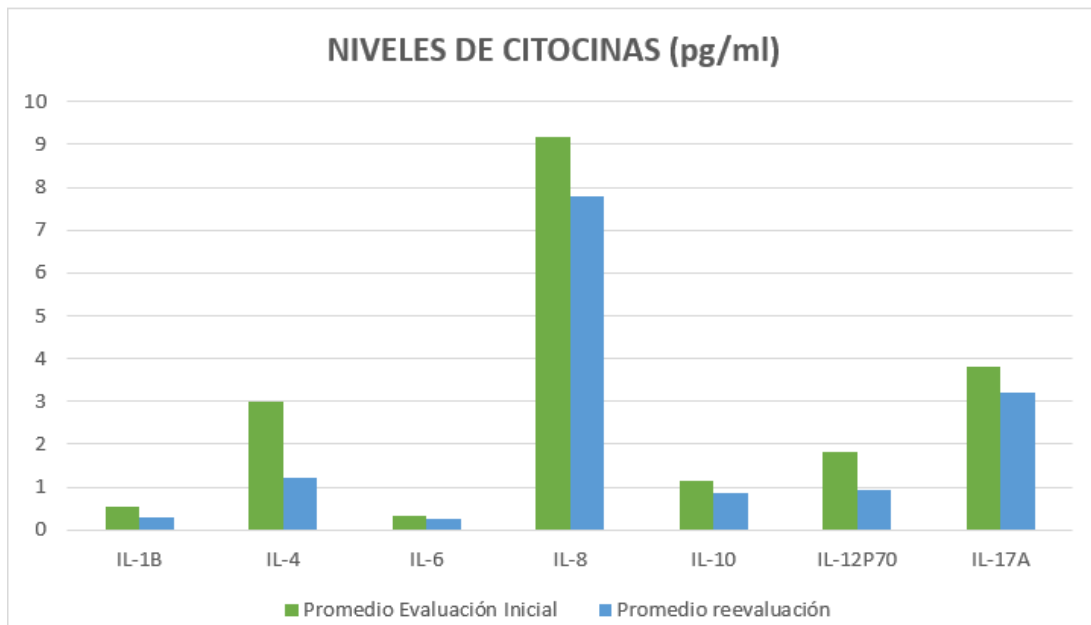


Gráfico 11: Niveles de citocinas IL-1B, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12P70, IL-17A (pg/ml) en la evaluación inicial y en la reevaluación.

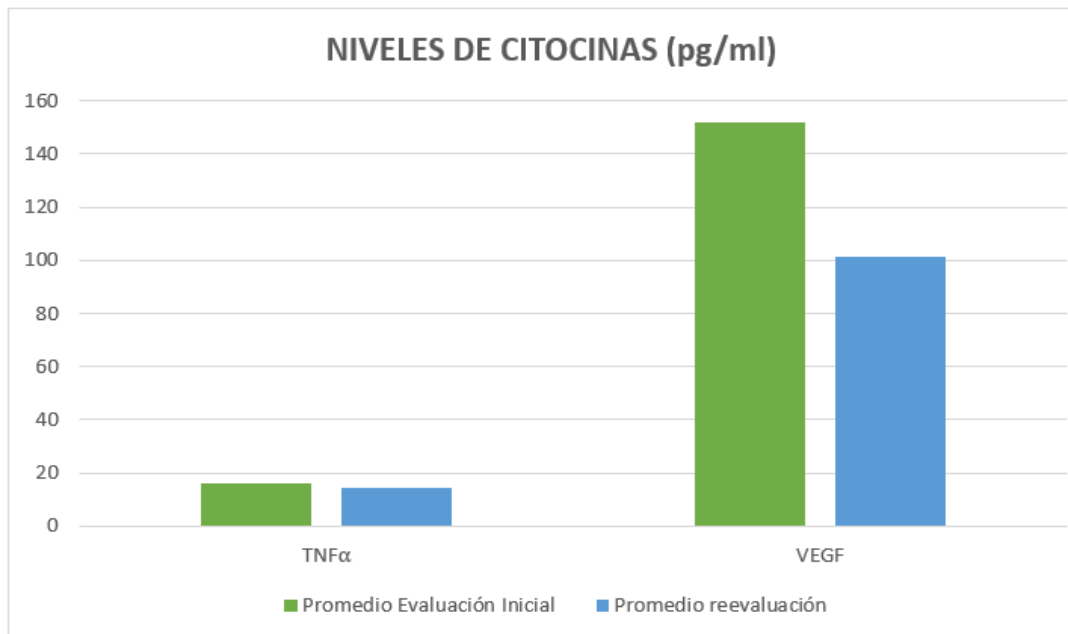


Gráfico 12: Niveles de citocinas TNF α , VEGF (pg/ml) en la evaluación inicial y en la reevaluación.

Discusión

La literatura científica ha evidenciado la relación que hay entre la hipertensión y la enfermedad periodontal debido a la respuesta inflamatoria que subyace a estas dos patologías. La terapia periodontal podría disminuir las concentraciones de biomarcadores de la inflamación e impactar de manera positiva en el desarrollo de la hipertensión. La terapia periodontal básica relacionada principalmente con raspaje y alisado radicular a campo cerrado al reducir la carga bacteriana local, disminuye la respuesta inflamatoria local y sistémica. El objetivo de este estudio era comprobar si el tratamiento periodontal de raspaje y alisado a campo cerrado mejoraba la respuesta inflamatoria sistémica por medio de la medición de biomarcadores de inflamación.

Al analizar los diagnósticos periodontales, de acuerdo a la clasificación de Caton y Cols. en 2017 se evidenció que tanto antes como después del tratamiento, 2 pacientes fueron diagnosticados con Periodontitis Estadio III Grado A, 10 con Periodontitis Estadio III Grado B, dos con Periodontitis Estadio IV Grado A y 5 con Periodontitis Estadio IV Grado B. Estos Hallazgos son coherentes con lo reportado en esta nueva clasificación, en donde los diagnósticos se mantienen, aunque se genere una mejoría de los parámetros clínicos periodontales. (17)

Mas allá del diagnóstico periodontal, la presente investigación encontró que al realizar el tratamiento periodontal básico se mejoraron los parámetros clínicos periodontales promedios como profundidad de bolsa (De 3.17 mm a 2.89 mm) nivel de inserción clínica (De 3.38 a 3.15) el índice de sangrado (de 58.43% a 39.75%) y el índice de biopelícula (de 41.36%. a 28.80%.) con diferencias estadísticamente significativas para todos los parámetros clínicos analizados. Estos hallazgos eran esperados y son consistentes con lo reportado por Aristizabal y colaboradores en

2013 quienes en una revisión sistemática sobre la disfunción endotelial y referenciando a Tonetti y colaboradores en 2007 y Li y colaboradores en 2011 reportaron que con el tratamiento periodontal se lograba una mejoría de los parámetros clínicos periodontales de profundidad de bolsa, sangrado al sondaje y porcentaje de biopelícula principalmente con la terapia periodontal intensiva la cual adicional al raspaje y alisado radicular a campo cerrado incluía el uso de antibióticos locales como la doxiciclina y la minociclina. (4)

En el artículo de Muhammad Albush y Cols., del 2013, sobre el efecto del tratamiento periodontal quirúrgico y no quirúrgico en marcadores vasculares en pacientes hipertensos, tanto el grupo quirúrgico como el grupo no quirúrgico presentaron disminución estadísticamente significativa en los parámetros clínicos periodontales. Estos resultados concuerdan con nuestro estudio, sin embargo, en esta investigación se realizó terapia periodontal no quirúrgica en todos los pacientes de la muestra. (18)

Así mismo estos resultados son comparables con los de Zhou SY y Cols., quienes evaluaron el efecto de la terapia periodontal no quirúrgica en pacientes hipertensos luego de 3 meses. Observaron que los niveles clínicos: profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica, índice de biopelícula e índice de sangrado; mejoraron significativamente. (12)

En cuanto a la presión arterial antes y después del tratamiento, se evidenció una leve disminución en la presión arterial sistólica y diastólica que fue estadísticamente significativamente para la diastólica (de 86.10 mmHg a 83.15 mmHg luego del tratamiento). Este hallazgo es coincidente con el estudio de Pietropaoli D. y Cols. en 2014, en donde se encontró que, entre los adultos hipertensos tratados, la presión arterial sistólica media fue aproximadamente 2.3 a 3 mmHg más alta en presencia de periodontitis ($P < 0.0001$) señalando adicionalmente que una buena salud periodontal se asocia con un mejor perfil de presión arterial sistólica durante la terapia antihipertensiva. (19)

Hay que tomar en consideración, que para el presente estudio se incluyó una muestra de pacientes que se estaban todos en tratamiento médico antihipertensivo. Es por este motivo que se puede atribuir el leve cambio de la presión arterial pre y postratamiento, que no fue significativo para la presión sistólica y diastólica. Sin embargo, consideramos que aun una diferencia de 1.89 (presión sistólica) y 2.94 (presión diastólica) mmHg a una mejoría en la condición sistémica de pacientes hipertensos.

La evidencia en la literatura sobre el cambio en la tensión arterial posterior al tratamiento periodontal es controversial. D'Aiuto y Cols., en el 2013, en una revisión sistemática cuestionó los criterios de selección y la medicación antihipertensiva de los pacientes, ellos encontraron que hay evidencia limitada sobre efectos de la terapia periodontal sobre el cambio en la presión arterial. Estos hallazgos apoyarían nuestros resultados en donde a pesar que los pacientes eran hipertensos controlados se logró evidenciar igualmente una leve mejoría. (20)

En la revisión sistemática de Muñoz- Aguilera y Cols., encontraron una prevalencia de hipertensión en pacientes con enfermedad periodontal versus aquellos sin esta. Se concluye que la periodontitis podría estar asociada con un mayor riesgo de hipertensión de forma lineal. Además, el manejo de la periodontitis podría afectar el manejo de la hipertensión. Los hallazgos resaltan el potencial para mejorar los resultados de enfermedad cardiovascular al abordar la mala salud bucal en la población general. (21)

Cuando se analizó la respuesta inflamatoria sistémica a través de los niveles de citocinas se evidenció una disminución posterior al tratamiento periodontal en todas las interleucinas analizadas: IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12P70, IL-17A, TNF α y VEGF, con diferencia estadísticamente significativa para las citocinas IL-1B y VEGF (p=0.04 y p=0.004).

En este sentido, la literatura igualmente ha analizado las citocinas inflamatorias sistémicas posterior al tratamiento periodontal. Montenegro y Cols., evaluaron pacientes con enfermedad coronaria estable y periodontitis. El grupo de prueba recibió terapia periodontal no quirúrgico, mientras que el grupo de control recibió una sesión de control de biopelícula. Los niveles plasmáticos de proteína C reactiva (PCR), hemoglobina glicosilada, lípidos y citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IFN- γ y TNF- α) se midieron al inicio del estudio y después de 3 meses. La investigación concluyó que la terapia periodontal no quirúrgica conduce a niveles más bajos de PCR, IL-6 e IL-8 en pacientes cardiovasculares. (22)

Por su parte, D'Isidoro y colaboradores en 2019 en una revisión sistemática, analizaron la influencia del tratamiento periodontal no quirúrgico sobre los biomarcadores de inflamación, e incluyeron el artículo de Duzagac, del 2016, en donde avaluaban las citocinas como la IL 6, IL10, TNF α y reportaron que el tratamiento periodontal contribuía a la resolución de la inflamación oral y que podría influir positivamente sobre los niveles de biomarcadores de inflamación sistémica. Señalaban, que la fase inicial de terapia periodontal tenía un impacto positivo en la reducción a corto plazo de los biomarcadores considerados como indicadores de riesgo para la enfermedad cardiovascular. (23)

Así mismo Roca-Millan E. y Cols., también en una revisión sistemática y metaanálisis, encontraron disminución de PCR, TNF β , pero no de la IL-1 α , luego de la instrumentación no quirúrgica e instrucción de higiene oral y aunque no mostraron mejoría en los niveles de perfiles lipídicos, si reportaron una reducción del LDL, de los niveles de leucocitos y de la presión sistólica. Destacaban que los cambios significativos se obtuvieron a los 2 o 3 meses posterior del tratamiento, a diferencia de nuestro estudio, el cual los cambios fueron observados al mes del tratamiento (1)

Higashi y col. en el 2009, realizaron un ensayo clínico controlado aleatorizado y evaluaron dos grupos: pacientes con enfermedad cardiovascular con periodontitis y sin periodontitis. Se midieron los biomarcadores IL-6 y la PCR ultra-sensible. El grupo con periodontitis presentaba aumento de la IL-6 y la PCR en comparación al grupo control, sin embargo, luego del tratamiento periodontal los biomarcadores de inflamación analizados disminuyeron. Estos resultados son comparables con nuestro estudio ya que hubo una reducción en los niveles de IL-6. (5)

Igualmente, y corroborando nuestros resultados, Vidal y Cols en 2009, analizaron el efecto de la terapia periodontal sobre los niveles en plasma de IL-6, proteína C reactiva, y fibrinógeno en pacientes con periodontitis severa e hipertensión arterial refractaria. Reportaron que hubo una reducción significativa de PCR y de IL-6 después de tres meses del tratamiento en el grupo experimental y un aumento significativo de estos biomarcadores en el grupo control (24)

Por su parte, Piconi y colaboradores en 2009, realizaron un ensayo clínico en 35 pacientes con periodontitis severa sin afección sistémica a los cuales se les realizó tratamiento periodontal básico,

recolectaron datos antes y 1, 3, 6, 12 meses después de la terapia periodontal. Ellos mostraron en sus resultados, que los biomarcadores de inflamación disminuyeron posterior al tratamiento periodontal con una reducción significativa de la carga bacteriana oral total. Estos resultados son coherentes con los encontrados en nuestro estudio, ya que los niveles de citocinas aumentaron posterior al tratamiento en lugar de disminuir. (25)

Se puede observar que en todos los artículos hay una disminución a corto plazo de biomarcadores de inflamación en pacientes con afecciones cardiovasculares. Además, se debe tomar en cuenta la importancia de la terapia periodontal, ya que el efecto de la misma a nivel local puede disminuir los niveles de inflamación sistémica, así mismo ayudando a controlar uno de los factores de riesgo de la hipertensión arterial, que es la inflamación sistémica. Por lo tanto, un manejo interdisciplinario en conjunto con el tratamiento periodontal, pueden contribuir a la mejora de la condición sistémica de los pacientes hipertensos mediante el control de los factores de riesgo.

Otro hallazgo relevante en los resultados obtenidos en nuestro estudio, fue la disminución estadísticamente significativa del Factor de crecimiento vascular endotelial, VEGF, que pasó de 152.10 a 101.55 con un valor de p de 0.004. El aumento de VEGF ha sido relacionado con hipertensión arterial y en este sentido Touyz y Cols., en 2017, analizaron los avances recientes en hipertensión y toxicidad cardiovascular con la inhibición del factor de crecimiento endotelial vascular. Enfatizaban que este biomarcador está asociado con una mayor incidencia de patologías cardiovasculares, incluyendo hipertensión, cardiopatía isquémica, insuficiencia cardíaca, prolongación del intervalo QT y tromboembolismo. La magnitud de la hipertensión inducida por este biomarcador es significativa, y casi todos los ensayos informan un aumento de la presión arterial (PA) por encima de 150/100 mm Hg. El desarrollo de hipertensión depende de la dosis de VEGF. (26)

Consideramos que la reducción significativa del biomarcador VEGF y además de la IL-1 β es un predictor importante en la mejoría de la inflamación sistémica de los pacientes con hipertensión arterial, que en conjunto con la mejora de otros factores de riesgo contribuyen a un mejor control de la enfermedad.

Conclusiones

Según el estudio realizado y tomando en cuenta las limitaciones del mismo, se puede concluir que el tratamiento periodontal no quirúrgico disminuye los niveles de citocinas proinflamatorias sistémicas en pacientes hipertensos. El tratamiento periodontal mejoró el nivel de tensión arterial y parámetros clínicos como profundidad de sondaje, nivel de inserción clínica, índice de sangrado y de biopelícula.

Estos hallazgos son de relevancia para el manejo interdisciplinario de pacientes hipertensos en el control de los factores de riesgo de su enfermedad. Se considera necesario realizar más estudios con un tiempo mayor en el seguimiento de los biomarcadores inflamatorios, sin embargo, se pueden tomar en cuenta los resultados obtenidos como parámetros predictores en estudios posteriores.

Referencias

1. Roca-Millan E, González-Navarro B, Sabater-Recolons MM, Mari-Roig A J-SEL-L. Periodontal treatment on patients with cardiovascular disease: Systematic review and meta-analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2018;23 (6):e68(doi:10.4317/medoral.22725. <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/v23i6/medoralv23i6p681.pdf>).
2. Li C, Lv Z, Shi Z, Zhu Y, Wu Y, Li L I-EZ. Periodontal therapy for the management of cardiovascular disease in patients with chronic periodontitis. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2017, Issue 11. Art. No.: CD009197. DOI: 10.1002/14651858.CD009197.pub3.
3. Mattila KJ, Nieminen MS, Valtonen V V., Rasi VP, Kesaniemi YA, Syrjala SL et al. Association between dental health and acute myocardial infarction. *Br Med J*. 1989;298(6676):779–81.
4. Aristizábal PA, Gómez MP, Escobar F VJ. Asociación entre enfermedad periodontal y disfunción endotelial. Revisión sistemática de la literatura. *Univ Odontol*. 2013 Jul-Dic; 32(69): 147-160.
5. Higashi Y, Goto C, Hidaka T, Soga J, Nakamura S, Fujii Y et al. Oral infection-in ammatory pathway, periodontitis, is a risk factor for endothelial dysfunction in patients with coronary artery disease. *Atherosclerosis*. 2009;206:604-10.
6. Czesnikiewicz-Guzik M, Osmenda G, Siedlinski M, Nosalski R, Pelka P NDG. Causal association between periodontitis and hypertension: evidence from Mendelian randomization and a randomized controlled trial of non-surgical periodontal therapy. *Eur Hear J*. 40(42):3459–3470. doi: 10.1093/eurheartj/ehz646.
7. Whelton PK, Carey RM, Aronow WS, Casey DE, Collins KJ, Himmelfarb. CD.2017 ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ ASPC/NMA/PCNA guideline for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood pressure in adults: Executive summary: A report of the American college of cardiology/American Heart Association task H 2018. 1269-1324 p.
8. J. M. Endotelio, inflamación e hipertensión arterial. *Rev Urug Cardiol* 2012; 27: 413-417.
9. Calle CM., Ángel MP., Duque A. GA. Enfermedad periodontal y su relación con las enfermedades cardiovasculares. *Rev. CES Odont*. 2012, Mayo; Vol. 25 (1): 82-91.
10. Contreras A. RJ. Relación entre periodontitis y enfermedad cardiovascular. *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2009, Agosto. Vol. 2 (2):91-7.).
11. LN. LJ. *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*. 5a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2009.
12. Zhou SY., Duan XQ. HRO. Effect of Non-surgical Periodontal Therapy on Serum Levels of TNF-a, IL-6 and C-reactive Protein in Periodontitis Subjects with Stable Coronary Heart Disease. *Chin J Dent Res*. 2013;16(2):145-51.
13. Elter, J., Hinderliter, A., Offenbacher, S., Beck, J., Caughey, M., Brodala, N. and Madianos P. The effects of periodontal therapy on vascular endothelial function: A pilot trial. *American Heart Journal*, 2006. 151(1), pp.47.e1-47.e6.
14. Orlandi, M., Suvan, J., Petrie, A., Donos, N., Masi, S., Hingorani, A., Deanfield, J. and D’Aiuto F. 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), pp.39-46.
15. Martin-Cabezas R., Seelam N., Petit C., Agossa K., Gaertner S., Tenenbaum H. DJ-L and H. Association between periodontitis and arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis. 2016. Julio;180:98-(112).

16. Ramich, T., Asendorf, A., Nickles, K., Oremek GM., Schubert R., Nibali L., Wohfeil M. EP. Inflammatory serum markers up to 5 years after comprehensive periodontal therapy of aggressive and chronic periodontitis. *Clin Oral Invest.* 2018, February. DOI: 10.1007/s00784-018-2398-x.
17. Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple ILC, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89 Suppl 1:S1-S8.
18. Al Bush MM, Razan KK RA. Effect of surgical and non-surgical periodontal debridement on vascular thrombotic markers in hypertensives. *J Indian Soc Periodontol.* 2013 May;17(3):324-9. doi: 10.4103/0972-124X.115654.
19. Pietropaoli, D., Pinto, R., Ferri, C., Jackson T. MA. Poor Oral Health and Blood Pressure Control Among US Hypertensive Adults Results From the National Health and Nutrition Examination Survey 2009 to 2014. *Hypertension.* 2018 October 22;72(6):1365-1373. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.11528.
20. D’Aiuto, F., Orlandi, M., & Gunsolley JC. Evidence that periodontal treatment improves biomarkers and CVD outcomes. *J Clin Periodontol.* 2013 Apr;40 Suppl 14:S85-105. doi: 10.1111/jcpe.12061.
21. Muñoz Aguilera E, Suvan J, Buti J, Czesnikiewicz-Guzik M, Barbosa Ribeiro A, Orlandi M, Guzik T, Hingorani AD NJD. Periodontitis is associated with hypertension: a systematic review and meta-analysis. *Cardiovasc Res.* 2019 Sep 24. pii: cvz201. doi: 10.1093/cvr/cvz201.
22. Montenegro M, Ribeiro I, Kampits C, Saffi M FMP et al. Randomized controlled trial of the effect of periodontal treatment on cardiovascular risk biomarkers in patients with stable coronary artery disease: Preliminary findings of 3 months. *J Clin Periodontol.* 2019 Mar;46(3):321-331.
23. D’Isidoro O, Perrotti V, Lai Hui W, Piattelli A IFQ. The impact of non-surgical therapy of periodontal disease on surrogate markers for cardiovascular disease: A literature review. *Am J Dent.* 2019 August;32(4):191-200.
24. Vidal F., Figueredo CMS., Cordovil I FR. Periodontal Therapy Reduces Plasma Levels of Interleukin-6, C-Reactive Protein, and Fibrinogen in Patients With Severe Periodontitis and Refractory Arterial Hypertension. *J Clin Periodontol.* 2009, Mayo. Vol. 80(5):786-791.
25. Piconi S, Trabattoni D, Luraghi C, Perilli E, Borelli M, Pacei M, Rizzardini G, Lattuada A, Bray DH, Catalano M, Sparaco A CM. Treatment of periodontal disease results in improvements in endothelial dysfunction and reduction of the carotid intima-media thickness. *FASEB J.* 2009 Apr; 23(4): 1196-204.
26. Touyz, R. M., Lang, N. N., Herrmann, J., van den Meiracker, A. H., & Danser AHJ. Recent Advances in Hypertension and Cardiovascular Toxicities With Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition. *Hypertension* (2017). 70(2), 220–226. doi:10.1161/hypertensionaha.117.08856.
27. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):1-6.