

Traballo de
fin de grao

Caracterización y capacidad predictiva del microbioma subgingival asociado a la periimplantitis

Caracterización e capacidade predictiva do microbioma subenxival asociado á periimplantite

Characterization and predictive capacity of the subgingival microbiome associated with peri-implantitis

Autora: Elena Lado Filgueiras

Titora: Inmaculada Tomás Carmona

Cotitora: Alba Regueira Iglesias

Departamento: Ciruxía e Especialidades
Médico-Quirúrxicas

XULLO 2025

Traballo de Fin de Grao presentado na Facultade de Medicina e Odontoloxía da Universidade de Santiago de Compostela para a obtención do Grao en Odontoloxía

ÍNDICE

RESUMEN	3
RESUMO	5
SUMMARY	7
1. Introducción	9
2. Material y métodos	11
2.1 Criterios de inclusión y exclusión. Tamaño muestral de los grupos de estudio...	11
2.2 Preprocesamiento y control de calidad de las secuencias.....	11
2.3 <i>Pipeline mothur</i>	11
2.4 Análisis estadístico con R-Bioconductor.....	12
3. Resultados	14
3.1 Estudios y bioproyectos incluidos en nuestro análisis	14
3.2 Análisis de alfa-diversidad	17
3.3 Análisis de la estructura de las comunidades microbianas.....	18
3.4 Análisis de abundancia diferencial	19
3.5 Análisis de modelado predictivo	22
4. Discusión	26
4.1 Análisis de alfa-diversidad	26
4.2 Análisis de la estructura de las comunidades microbianas.....	27
4.3 Análisis de abundancia diferencial	27
4.4 Análisis de modelado predictivo	28
4.5 Señales microbianas asociadas al microbioma subgingival en salud periimplantaria y periimplantitis	29
5. Conclusión	31
BIBLIOGRAFÍA	32

Agradecimientos

A mi padre, a mi madre y a mi hermana pequeña.

A mi tutora y cotutora por dejarme formar parte de la Unidad de Pacientes con Necesidades Especiales y por el apoyo realizando este trabajo.

A mis profesores.

A mis futuros pacientes.

RESUMEN

- **Objetivo:** Caracterizar la diversidad del microbioma subgingival en salud periimplantaria, periimplantitis, salud periodontal y periodontitis; y desarrollar modelos predictivos para distinguir entre salud periimplantaria y periimplantitis.
- **Material y métodos:** Se analizaron 167 muestras (salud periimplantaria-Imp H=36, periimplantitis-Imp P=41, salud periodontal-Sub H=45, periodontitis-Sub P=45). Las secuencias Illumina se procesaron con *mothur*, y la taxonomía se asignó con una base de datos específica oral. Los análisis estadísticos se realizaron en R-Bioconductor. La alfa-diversidad se evaluó con: ASVs observadas, índice de cobertura 95%, e índices Shannon y Pielou. La estructura microbiana se analizó mediante análisis de componentes principales (PCA) y PERMANOVA. Las diferencias de abundancia de las variantes de secuencia de amplicón (ASVs) se evaluaron con la prueba U Mann-Whitney. Los modelos predictivos se construyeron mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales dispersos y *random forest*.
- **Resultados:** Se observaron más ASV en salud periimplantaria que en periimplantitis (421,00 vs. 288,00; $p < 0,01$). La riqueza y diversidad periimplantarias fueron menores a las periodontales en salud (cobertura=97,50 vs. 178,00; $p < 0,05$) y enfermedad (cobertura=83,00 vs. 132,00; Shannon=3,59 vs. 4,14; Pielou=0,62 vs. 0,68; $p < 0,01$). El PCA mostró una agrupación de muestras según grupo de pertenencia ($p < 0,01$). Las mayores diferencias de ASVs abundantes se observaron entre Imp H vs. Imp P (87 ASVs) y Sub H (76); siendo menores entre Imp P y Sub P (29). El modelo Imp H vs. Imp P incluyó 50 ASVs y obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0,87, con exactitud del 80,95%, sensibilidad del 92,06% y especificidad del 69,84%.
- **Conclusiones:** La placa subgingival en salud periimplantaria es más rica que en periimplantitis. El microbioma subgingival periimplantario es menos alfa-diverso que el periodontal en salud y enfermedad. Además, la estructura de los microbiomas varía significativamente entre grupos de estudio. En términos de abundancia, el microbioma subgingival difiere marcadamente entre salud periimplantaria y periimplantitis. Las diferencias entre salud periimplantaria y salud periodontal son mayores que entre las respectivas situaciones de enfermedad. Finalmente, nuestro modelo predictivo demuestra una capacidad

excelente para discriminar entre salud periimplantaria y periimplantitis, apoyando el uso del microbioma subgingival como herramienta diagnóstica de precisión de la condición clínica periimplantaria.

Palabras clave: microbioma, subgingival, implante dental, diente, diversidad, modelado predictivo.

RESUMO

- **Obxectivo:** Caracterizar a diversidade do microbioma subenxival en saúde periimplantaria, periimplantite, saúde periodontal e periodontite; e desenvolver modelos predictivos para distinguir entre saúde periimplantaria e periimplantite.
- **Material e métodos:** Analizáronse 167 mostras (saúde periimplantaria-Imp H=36, periimplantite-Imp P=41, saúde periodontal-Sub H=45, periodontite-Sub P=45). As secuencias Illumina procesáronse con *mothur*, e a taxonomía asignouse cunha base de datos específica oral. As análises estatísticas realizáronse en R-Bioconductor. Avaliouse a alfa-diversidade mediante: ASVs observadas, índice de cobertura 95%, e os índices de Shannon e Pielou. A estrutura microbiana analizouse mediante análise de compoñentes principais (PCA) e PERMANOVA. As diferenzas de abundancia das variantes de secuencia de amplicón (ASVs) avaliáronse coa proba U de Mann-Whitney. Os modelos predictivos construíronse mediante análise discriminante de mínimos cadrados parciais dispersos e *random forest*.
- **Resultados:** Observáronse máis ASVs en saúde periimplantaria ca en periimplantite (421,00 vs. 288,00; $p < 0,01$). A riqueza e diversidade periimplantarias foron menores ás periodontais tanto en saúde (cobertura=97,50 vs. 178,00; $p < 0,05$) como en enfermidade (cobertura=83,00 vs. 132,00; Shannon=3,59 vs. 4,14; Pielou=0,62 vs. 0,68; $p < 0,01$). A PCA mostrou unha agrupación das mostras segundo o grupo de pertenza ($p < 0,01$). As maiores diferenzas de ASVs abundantes observáronse entre Imp H vs. Imp P (87 ASVs) e Sub H (76); sendo menores entre Imp P e Sub P (29). O modelo Imp H vs. Imp P incluíu 50 ASVs e obtivo unha área baixo a curva (AUC) de 0,87, cunha exactitude do 80,95%, sensibilidade do 92,06% e especificidade do 69,84%.
- **Conclusións:** A placa subenxival en saúde periimplantaria é máis rica ca na periimplantite. O microbioma subenxival periimplantario é menos alfa-diverso que o periodontal en saúde e enfermidade. Ademais, a estrutura dos microbiomas varía de xeito significativo entre os grupos de estudo. En termos de abundancia, o microbioma subenxival difire notablemente entre saúde periimplantaria e periimplantite. As diferenzas entre saúde periimplantaria e saúde periodontal son maiores ca entre as respectivas condicións de enfermidade. Finalmente, o noso modelo predictivo demostra unha excelente capacidade para discriminar entre

saúde periimplantaria e periimplantite, apoiando o uso do microbioma subenxival como ferramenta diagnóstica de precisión da condición clínica periimplantaria.

Palabras chave: microbioma, subenxival, implante dental, dente, diversidade, modelado predictivo.

SUMMARY

- **Objective:** To characterize the diversity of the subgingival microbiome in peri-implant health, peri-implantitis, periodontal health, and periodontitis; and to develop predictive models to distinguish between peri-implant health and peri-implantitis.
- **Materials and Methods:** A total of 167 samples were analysed (peri-implant health-Imp H = 36, peri-implantitis-Imp P = 41, periodontal health-Sub H = 45, periodontitis-Sub P = 45). Illumina sequences were processed using *mothur*, and taxonomy was assigned using an oral-specific database. Statistical analyses were performed in R-Bioconductor. Alpha diversity was assessed using observed ASVs, 95% coverage index, and the Shannon and Pielou indices. Microbial structure was analysed through principal component analysis (PCA) and PERMANOVA. Differences in the abundance of amplicon sequence variants (ASVs) were evaluated using the Mann-Whitney U test. Predictive models were built using sparse partial least squares discriminant analysis and random forest.
- **Results:** More ASVs were observed in peri-implant health than in peri-implantitis (421.00 vs. 288.00; $p < 0.01$). Peri-implant richness and diversity were lower than periodontal in both health (coverage= 97.50 vs. 178.00; $p < 0.05$) and disease (coverage= 83.00 vs. 132.00; Shannon= 3.59 vs. 4.14; Pielou= 0.62 vs. 0.68; $p < 0.01$). The PCA showed clustering of samples according to group to which they belonged ($p < 0.01$). The largest differences in abundant ASVs were found between Imp H vs. Imp P (87 ASVs) and Sub H (76); with fewer differences between Imp P and Sub P (29). The Imp H vs. Imp P model included 50 ASVs and achieved an area under the curve (AUC) of 0.87, with an accuracy of 80.95%, sensitivity of 92.06%, and specificity of 69.84%.
- **Conclusions:** Subgingival plaque in peri-implant health is richer than in peri-implantitis. The subgingival peri-implant microbiome is less alpha-diverse than the periodontal microbiome in both health and disease. Additionally, microbiome structure differs significantly across study groups. In terms of abundance, the subgingival microbiome shows marked differences between peri-implant health and peri-implantitis. Differences between peri-implant and periodontal health are greater than those between the respective disease conditions. Finally, our predictive model shows excellent ability to discriminate between peri-implant

health and peri-implantitis, supporting the use of the subgingival microbiome as a precision diagnostic tool for peri-implant clinical status.

Keywords: microbiome, subgingival, dental implant, tooth, diversity, predictive modelling.

1. INTRODUCCIÓN

La pérdida parcial o total de dientes, esta última denominada edentulismo, suele ocurrir como consecuencia de las enfermedades orales más prevalentes a nivel mundial: caries y periodontitis (1). En este contexto, se estima que un 7% de la población mayor de 20 años es edéntula, cifra que asciende hasta el 23% en mayores de 60 años (2). Entre las opciones terapéuticas para rehabilitar la pérdida dental, los implantes son una de las alternativas más utilizadas y eficaces, con una tasa de supervivencia aproximada del 92% (1,3).

La colocación de implantes dentales puede generar complicaciones biológicas, siendo la periimplantitis la más destacada (4). Con una prevalencia del 20% a nivel paciente y del 13% a nivel implante (5), esta enfermedad inflamatoria crónica, que afecta a los tejidos periimplantarios, se asocia a una disbiosis del microbioma oral; es decir, a un desequilibrio microbiano que favorece la colonización de patógenos en la superficie del implante (4). Esto desencadena una respuesta inflamatoria del huésped que provoca una pérdida progresiva del hueso alveolar en torno al implante osteointegrado funcional (6).

El microbioma periimplantario se ha estudiado mediante técnicas microbiológicas diversas, desde los cultivos (7) y la hibridación de ADN (8) hasta la reacción en cadena de la polimerasa (*polymerase chain reaction* en inglés, PCR) (9) y la secuenciación de nueva generación (*next-generation sequencing*, NGS). Entre todas ellas, destaca la secuenciación de amplicones del gen ARN ribosomal (ARNr) 16S (10), que permite caracterizar la estructura y composición microbianas de forma precisa.

La secuenciación es el procedimiento por el que se determina la disposición de los nucleótidos en una molécula de ADN. Por otro lado, el gen ARNr 16S, ubicuo en bacterias y arqueas, es uno de los marcadores moleculares más utilizados en estudios de filogenia y taxonomía (11,12). A lo largo de sus ~1.500 pares de bases (pbs), se distribuyen diez regiones conservadas (C1–C10) y nueve hipervariables (V1–V9). Esta arquitectura permite el diseño de cebadores universales en las zonas conservadas y la discriminación taxonómica mediante las regiones variables (12). Además, el uso del gen 16S se ha visto reforzado por la disponibilidad de bases de datos extensas y accesibles (12).

En la literatura, la metabarcodificación del gen ARNr 16S se ha utilizado para analizar el microbioma subgingival periimplantario desde el punto de vista de la diversidad (13), la composición central (14) o las redes de coocurrencia microbiana (15). No obstante, la capacidad del microbioma subgingival para discriminar entre salud periimplantaria y

periimplantitis ha sido escasamente investigada, existiendo solo una publicación al respecto, la cual presenta limitaciones relevantes (16).

Principalmente, la selección de variables se basó en los 15 géneros bacterianos y citoquinas con mayor correlación con los parámetros clínicos periimplantarios. A diferencia de los métodos estadísticos diseñados para seleccionar variables predictivas (17), este enfoque no considera la dependencia entre variables ni asegura la inclusión de taxones relevantes. Asimismo, la combinación de variables obtenidas a través de técnicas de laboratorio distintas puede dificultar la implementación clínica del modelo.

Dado lo anterior, el objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado es caracterizar la diversidad del microbioma subgingival en salud periimplantaria y periimplantitis, y compararla con la propia en salud periodontal y periodontitis; y desarrollar modelos predictivos basados en el microbioma subgingival para distinguir entre salud periimplantaria y periimplantitis. Las muestras de estudio se obtendrán de bioproyectos previos Illumina V3-V4 y se analizarán mediante un protocolo bioinformático y estadístico homogéneo. Además, se aplicarán las mejores prácticas metodológicas disponibles tanto para los estudios de secuenciación 16S (18) como para los análisis de diversidad y modelado predictivo (19).

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Criterios de inclusión y exclusión. Tamaño muestral de los grupos de estudio

El presente estudio incluye estudios sobre la microbiota de la placa subgingival en pacientes adultos con periimplantitis, salud periimplantaria, periodontitis y salud periodontal, los cuales analizaron la región V3-V4 del gen ARNr 16S mediante la tecnología de secuenciación Illumina. Estos estudios forman parte de un biobanco de secuencias de dicho gen de acceso público desarrollado por nuestro grupo de investigación *Oral Sciences Research Group (OSRG)*, para llevar a cabo objetivos previos (20,21).

Los estudios fueron elegidos siempre y cuando, independientemente del criterio diagnóstico aplicado, incluyeran una referencia estándar para el diagnóstico de una condición periodontal basada en parámetros clínicos (profundidad de sondaje *-probing pocket depth*, PPD-, nivel de inserción clínica *-clinical attachment level*, CAL-) o en parámetros clínicos y radiográficos (pérdida ósea). Sin embargo, se excluyeron aquellos estudios que no contaran con una referencia para el diagnóstico o que no evaluaran el estado periodontal de un sujeto utilizando al menos un parámetro clínico.

Los criterios de inclusión y exclusión para los metadatos y las secuencias almacenadas fueron los aplicados por nuestro grupo de investigación en trabajos previos (20,21)

Con respecto al entorno subgingival periimplantario, seleccionamos un total de 77 muestras clasificadas en los grupos de salud periimplantaria (Imp H= 36) y periimplantitis (Imp D= 41). Para mantener los grupos de estudio con tamaños muestrales balanceados, de los especímenes subgingivales obtenidos para salud periodontal, se seleccionaron un total de 90 (Sub H= 45; Sub P= 45).

2.2 Preprocesamiento y control de calidad de las secuencias

El preprocesamiento y evaluación de calidad de las secuencias se realizó con USEARCH (22) aplicando el protocolo previamente desarrollado por nuestro grupo de investigación en trabajos previos (20).

2.3 Pipeline mothur

Se empleó el *pipeline mothur* (23) para ASVs con ligeras modificaciones, entre las que se incluyen el uso de la base de datos específica oral de Escapa *et al.* (24) para la asignación taxonómica. Se permitieron secuencias con más de 400 pbs, pero se

eliminaron aquellas con >8 homopolímeros, las consideradas como quimeras por el algoritmo VSEARCH (25), así como las clasificadas como taxón desconocido en el nivel jerárquico más alto (es decir, bacteria). Las secuencias no se agruparon a ningún nivel, ya que nuestro objetivo era identificar y clasificar el mayor número posible de secuencias a nivel ASV. Finalmente, la tabla de conteos, la jerarquía taxonómica a nivel ASV, el árbol filogenético y la tabla de metadatos fueron exportados a R-Bioconductor (26).

2.4 Análisis estadístico con R-Bioconductor

El análisis estadístico de la información de secuenciación del gen ARNr 16S a nivel ASV se realizó con R (27) y R-Bioconductor (26) para leer la información y crear el objeto phyloseq (paquete phyloseq) (28). Las muestras con menos de 2.500 secuencias fueron excluidas. Se excluyeron las ASVs con una abundancia menor o igual a 10 y presentes en menos de 2 muestras.

Indicadores de alfa-diversidad

Los paquetes phyloseq y microbiome se emplearon para obtener los datos de alfa-diversidad (28,29). Como indicadores de la riqueza de especies, calculamos los datos de conteos absolutos (ASVs observadas) y el índice de cobertura 95%, que define cuántas de las ASVs más abundantes se requieren para alcanzar una proporción particular del ecosistema ocupado (en este caso, el 95%). Los índices Shannon y Pielou se establecieron como indicadores de la diversidad y distribución de las ASVs presentes en las muestras. La prueba U de Mann-Whitney-Wilcoxon (dos colas) se utilizó para realizar los análisis comparativos.

Previo a la realización de los siguientes análisis, se realizó una transformación log-cociente centrada (*centered log-ratio*, CLR) empleando el paquete mixOmics (30). Después, los análisis se realizaron utilizando la matriz de datos con la transformación CLR.

Análisis de la estructura de las comunidades microbianas

Se realizó un análisis de componentes principales (*principal component analysis*, PCA) para visualizar el agrupamiento de las muestras subgingivales en función del grupo al que pertenecían. Mediante el paquete mixOmics (30) se obtuvo el diagrama de dispersión de los dos componentes principales basado en la abundancia relativa de las ASVs,

mostrando los centroides de cada grupo clínico y de las elipses representando el intervalo de confianza del 95%. Después, se aplicó el análisis multivariante de la varianza no paramétrica permutacional (*permutational multivariate analysis of variance*, PERMANOVA) (31) para medir las diferencias multivariantes a nivel de comunidad entre los grupos. Estos análisis se realizaron con el paquete *vegan* (32).

Análisis de abundancia diferencial

La diferencia en las medianas de las abundancias de las 300 ASVs más abundantes entre grupos fue evaluada utilizando la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney-Wilcoxon. El valor p obtenido se ajustó con la corrección de Benjamini-Hochberg utilizando el paquete *mutoss* (33). En relación con cada ASV, obtuvimos su correspondiente tamaño de efecto, incluyendo su intervalo de confianza y magnitud (grande, medio, pequeño y despreciable), usando las estadísticas d de Cohen y g de Hedges del paquete *effsize* (34). Se consideró que las ASVs con un tamaño de efecto grande, medio y pequeño y un valor p ajustado $<0,05$ tenían abundancia diferencial entre grupos.

Análisis de modelado predictivo

Utilizamos el paquete *mixOmics* (30) para llevar a cabo una clasificación supervisada mediante *sparse partial least-square discriminant analysis* (sPLS-DA) (35). Esto se hizo para facilitar la categorización de los grupos de estudio Imp H e Imp D e identificar las ASVs que mejor los diferenciaban. Se seleccionaron un total de 50 variables entre dichos grupos de estudio.

A continuación, aplicando el proceso del algoritmo genético adaptado con el paquete *GA* (36) y la técnica de aprendizaje automático *random forest* con el paquete *caret* (37) una validación cruzada *3-fold* para controlar el sobreajuste, se seleccionó el mejor modelo según el valor de exactitud (*accuracy*, ACC).

Finalmente, se calcularon los siguientes parámetros de rendimiento: área bajo la curva (*area under the curve*, AUC), ACC, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (*positive predictive value*, PPV) y valor predictivo negativo (*negative predictive value*, NPV). Se construyó la Curva Característica Operativa del Receptor (*Receiver Operating Characteristic*, ROC) y el plano de predicción de muestras con el paquete *precrec* (38).

3. RESULTADOS

3.1 Estudios y bioproyectos incluidos en nuestro análisis

La Figura 1 muestra el flujo de trabajo seguido para seleccionar las investigaciones para ser incluidas en nuestro estudio.

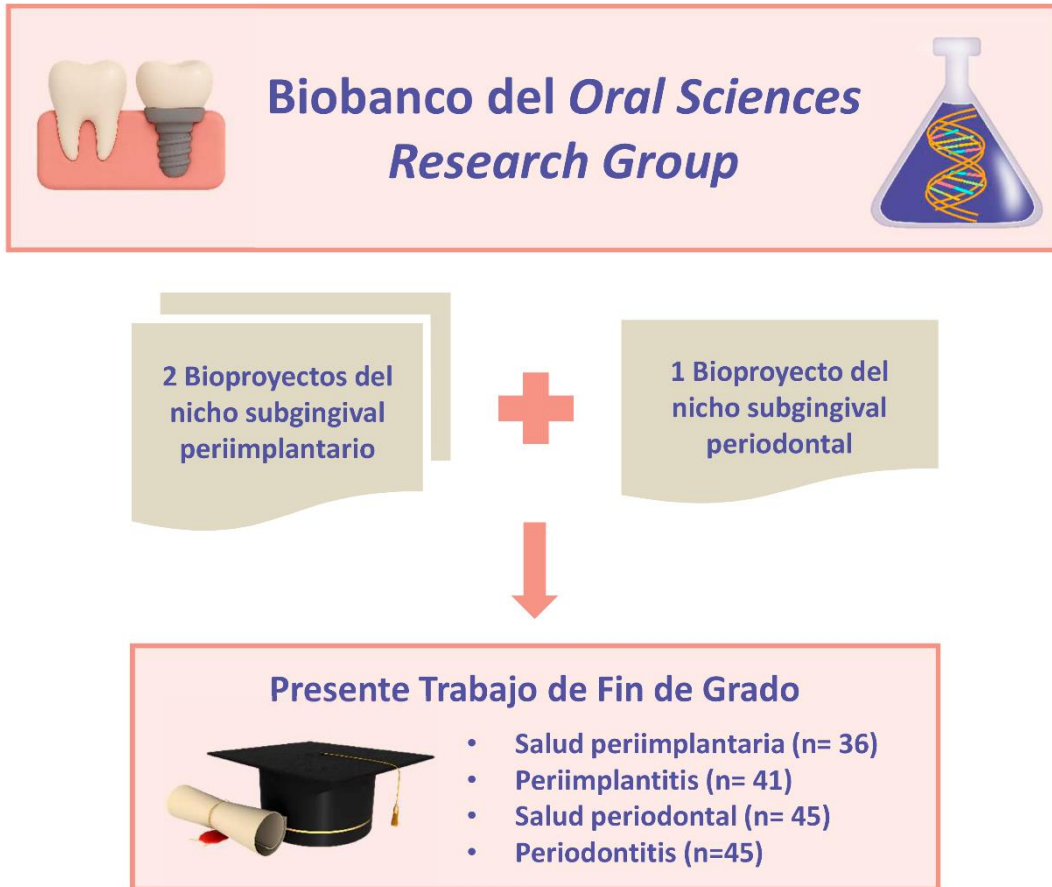


Figura 1. Grupos de estudio y número de muestras incluidos en nuestro análisis a partir del biobanco del Oral Sciences Research Group.

Del banco de secuencias del gen ARNr 16S del OSRG (20,21), se incorporaron al presente estudio dos artículos y bioproyectos centrados en el entorno subgingival periimplantario. En cuanto al entorno subgingival periodontal, los datos seleccionados para la inclusión provinieron de un bioproyecto propio del grupo de investigación (PRJNA773202) (21).

Características de los estudios y bioproyectos incluidos en nuestro análisis

La Tabla 1 presenta las principales características de los estudios de secuenciación del microbioma periimplantario seleccionados para nuestro trabajo. En ella se observa que solo un tercio de las investigaciones incluidas (1/3; 33,33%) establecieron el diagnóstico periimplantario y/o periodontal basándose en la Clasificación de Enfermedades y Condiciones Periodontales y Periimplantarias (39). En todos los estudios se recogieron muestras de placa subgingival (3/3; 100,00%), predominando aquellos que comparan a pacientes sanos con pacientes con enfermedades periimplantarias y/o periodontales (2/3; 66,67%). En contraposición, un único estudio se centró exclusivamente en individuos con periimplantitis y periodontitis, sin incluir un grupo control de sujetos sanos (1/3; 33,33%). Asimismo, todos los trabajos se realizaron en sujetos sistémicamente sanos (3/3; 100,00%). En cuanto al hábito tabáquico, dos de los estudios incluyeron tanto a fumadores como a no fumadores (2/3; 66,67%), mientras que uno de ellos se limitó exclusivamente a participantes no fumadores (1/3; 33,33%).

Tabla 1. Principales características de los estudios incluidos en nuestro análisis

Primer autor, año, bioproyecto	CEP 2018	Edad	Sexo	Etnia	Condición oral	Condición sistémica	Tabaco
		Pcte	Pcte	Pcte	Muest	Pcte	Pcte
Yu et al. 2019 PRJNA477241	NO	Media ± DE (rango): 54 ,8±14,9 (30 - 80)	M (9) H (9)	NSp (18)	PI (18) P (18) IS (18) S (18)	Salud (18)	NF (16) F (2)
Komatsu et al. 2020 PRJDB9395	SI	Media ± DE: 67,2±7,8	M (9) H (12)	NSp (21)	PI (21)* P (21)*	Salud (21)	NF (21)
Datos no publicados PRJNA773202	NO	Media (rango): 49,53 (24–75)	M (65) H (53)	Cauc (118)	DS (53) P Gen Mod (6) P Gen Sev (59)	Salud (118)	NF (74) F (44)

*El bioproyecto incluía dos muestras bien categorizadas adicionales a las indicadas en el estudio original.

Cauc: caucásico; CEP: Clasificación de las Enfermedades Periodontales; DE: desviación estándar; F: fumadores; Gen: generalizada; H: hombres; IS: salud periimplantaria; M: mujeres; Mod: moderada; Muest: muestras; NF: no fumadores; NSp: no especificado; P: periodontitis; Pcte: paciente; PI: periimplantitis; S: salud periodontal; Sev: severa.

3.2 Análisis de alfa-diversidad

Como se observa en la Tabla 2, el microbioma subgingival en salud periimplantaria presentó una riqueza significativamente mayor en términos de ASVs observadas en comparación con la periimplantitis (421,00 vs. 288,00; $p < 0,01$). Al contrastar los entornos periimplantario y periodontal, se evidenció una menor cobertura muestral en los implantes, tanto en estados de salud (97,50 vs. 178,00; $p < 0,05$) como en enfermedad (83,00 vs. 132,00; $p < 0,01$). Asimismo, tal y como indican los índices de Shannon y Pielou, el grupo con periimplantitis mostró una menor diversidad y una distribución menos uniforme en relación con el grupo con periodontitis (Shannon= 3,59 vs. 4,14; Pielou= 0,62 vs. 0,68; $p < 0,01$ en ambas comparativas).

Por otro lado, al comparar condiciones opuestas de salud entre implantes y dientes naturales, se observaron niveles inferiores de diversidad y equitatividad en salud periimplantaria en comparación con la periodontitis (Tabla 2; $p < 0,01$). De igual manera, se registró una menor riqueza y diversidad en la periimplantitis con respecto a la salud periodontal (Tabla 2; $p < 0,05$).

Tabla 2. Indicadores de alfa-diversidad en los diferentes grupos de estudio.

Grupos	ASVs observadas		Cobertura 95%		Shannon		Pielou	
	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR	Mediana	IQR
Imp H	421,00	108,50	97,50	58,75	3,44	1,17	0,55	0,17
Imp P	288,00	186,00	83,00	55,00	3,59	0,74	0,62	0,11
Sub H	461,00	561,00	178,00	140,00	3,87	1,35	0,65	0,12
Sub P	329,00	396,00	132,00	117,00	4,14	0,83	0,68	0,09
Comparaciones								
Imp H vs. Imp P	0.0014		0.2699		0.9415		0.1018	
Imp H vs. Sub H	0.5478		0.0274		0.0870		0.1562	
Imp P vs. Sub P	0.0845		0.0042		3.8611 ⁻⁰⁵		0.0001	
Imp H vs. Sub P	0.3190		0.1051		0.0039		0.0003	
Sub H vs. Imp P	0.0006		0.0002		0.0132		0.5997	

Las celdas coloreadas de amarillo destacan las comparativas en las que se obtuvo significancia estadística ($p < 0,05$). ASVs: variantes de secuencia de amplicón; Imp H: salud periimplantaria; Imp P: periimplantitis; IQR: rango intercuartílico; Sub H: salud periodontal; Sub P: periodontitis.

3.3 Análisis de la estructura de las comunidades microbianas

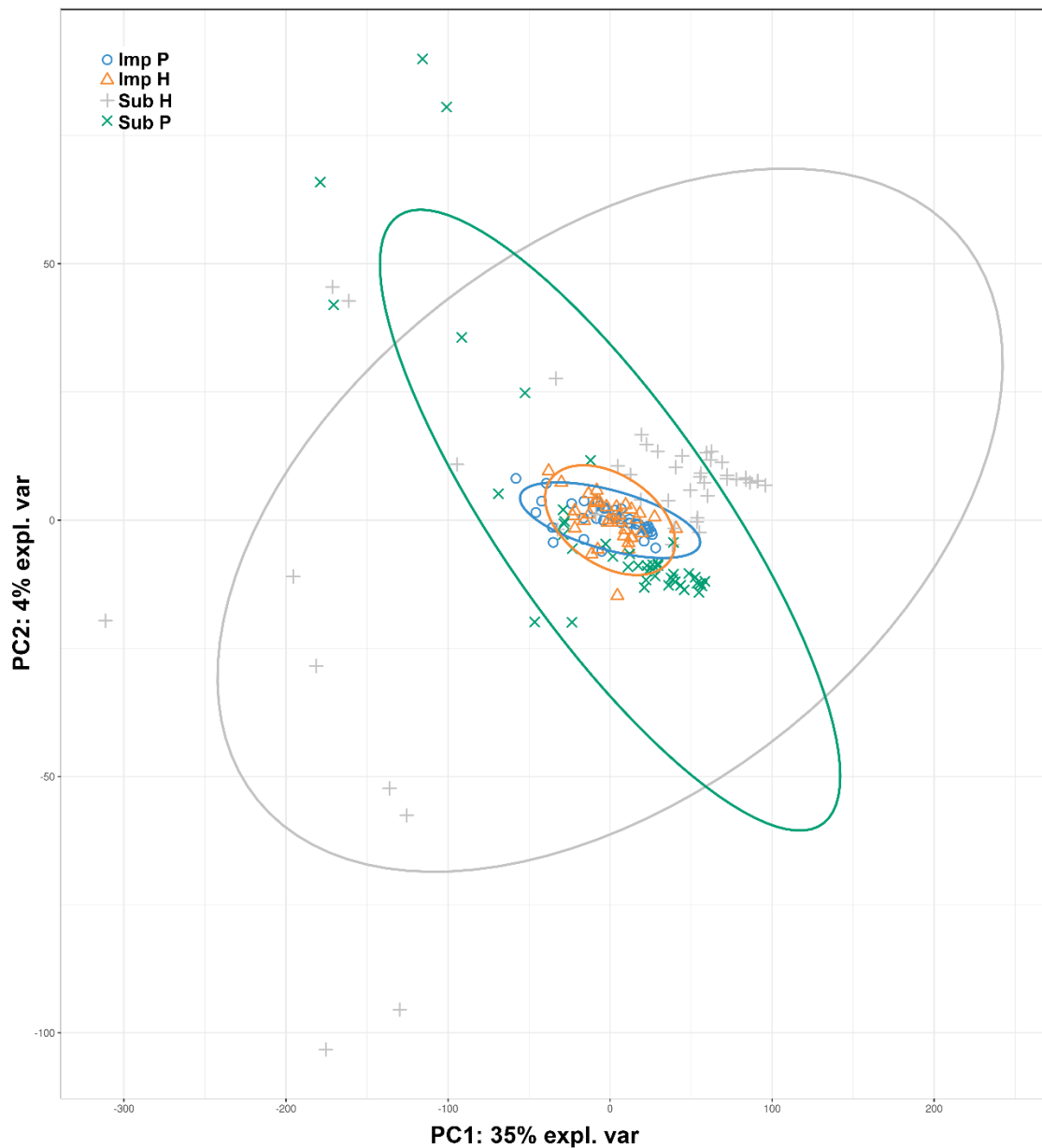


Figura 2. Análisis de componentes principales (PCA) de los distintos grupos de estudio.

Imp H: salud periimplantaria; Imp P: periimplantitis; Sub H: salud periodontal; Sub P: periodontitis.

La PCA reveló un agrupamiento de las muestras subgingivales de acuerdo con el grupo clínico al que pertenecían (Figura 2). Esta observación visual se confirmó con el test estadístico de PERMANOVA, que obtuvo diferencias significativas en las comparativas dos a dos entre todos los grupos de estudio ($p < 0,01$).

3.4 Análisis de abundancia diferencial

La tabla 3 resume los resultados del análisis de abundancia diferencial (tamaños del efecto: grande, mediano y pequeño; $p < 0,05$) entre los grupos de salud periimplantaria, periimplantitis, salud periodontal y periodontitis. Un total de 87 ASVs (29,00%) mostraron diferencias significativas en sus valores de abundancia CLR entre la salud periimplantaria y la periimplantitis. De estas, 34 ASVs (11,33%) obtuvieron las mayores diferencias entre ambas condiciones (rangos de tamaño del efecto: Imp H= -0,81 – -1,38; Imp P= 1.32 – 0.83). Además, comparando el número de taxones más abundantes en salud periimplantaria vs. periimplantitis, la mayoría de las ASVs con abundancia diferente estaban más presentes en la salud (52 ASVs, 17,33% vs. 35 ASVs, 11,67%).

Tabla 3. Número de ASVs con abundancia diferencial entre los grupos de estudio.

Tamaño del efecto	No. ASVs (% en la comparación)		
	Imp H vs. Imp P	Imp H	Imp P
Grande	34 (11,33%)	30 (10,00%)	4 (1,33%)
Todos	87 (29,00%)	52 (17,33%)	35 (11,67%)
Tamaño del efecto	Imp H vs. Sub H	Imp H	Sub H
Grande	34 (11,33%)	23 (7,67%)	11 (3,67%)
Todos	76 (25,33%)	48 (16,00%)	28 (9,33%)
Tamaño del efecto	Imp P vs. Sub P	Imp P	Sub P
Grande	14 (4,67%)	4 (1,33%)	10 (3,33%)
Todos	29 (9,67%)	10 (3,33%)	19 (6,33%)
Tamaño del efecto	Imp H vs. Sub P	Imp H	Sub P
Grande	41 (13,67%)	36 (12,00%)	5 (1,67%)
Todos	86 (28,67%)	46 (15,33%)	40 (13,33%)
Tamaño del efecto	Imp P vs. Sub H	Imp P	Sub H
Grande	44 (14,67%)	15 (5,00%)	29 (9,67%)
Todos	139 (46,33%)	86 (28,67%)	53 (17,67%)

En todas las comparaciones dos a dos se compararon un total de 300 ASVs.

ASVs: variantes de secuencia de amplificación; Imp H: salud periimplantaria; Imp P: periimplantitis; no.: número; Sub H: salud periodontal; Sub P: periodontitis.

Al comparar los nichos subgingivales periimplantarios con sus homólogos periodontales, se identificaron 76 ASVs (25,33%) con diferencias significativas en su abundancia entre grupos sanos. De estas, 34 ASVs (11,33%) presentaron un tamaño del efecto grande (rango: Imp H= 2,80 – 0,81; Sub H= -0,81 – -1,07). La mayoría de los taxones con abundancia diferencial se observaron en el grupo de salud periimplantaria (48 ASVs, 16,00% vs. 28 ASVs, 9,33%).

En contraste, el número de ASVs con abundancia diferencial entre periimplantitis y periodontitis se redujo a 29 (9,67%), de las cuales 14 ASVs (4,67%) mostraron un tamaño del efecto grande (rango: Imp P= 1,11 – 0,96; Sub P= -0,82 – -1,16). En este caso, la mayoría de las ASVs fueron más abundantes en periodontitis (19 ASVs, 6,33%) que en

periimplantitis (10 ASVs, 3,33%).

Por otro lado, se detectaron 86 ASVs (28,67%) con diferencias de abundancia entre la salud periimplantaria y la periodontitis. De estas, 41 ASVs (13,67%) mostraron las mayores diferencias entre grupos (rango: Imp H= 2,78 – 0,81; Sub P= -0,82 – -1,36). En este caso, las ASVs con abundancia diferencial estuvieron distribuidas de forma equilibrada entre grupos (Imp H= 46 ASVs, 15,33% vs. Sub P= 40 ASVs, 13,33%).

Finalmente, la comparación entre periimplantitis y salud periodontal reveló 139 ASVs (46,33%) con abundancia diferencial, de las cuales 44 (14,67%) presentaron un tamaño del efecto grande (rango: Imp P= 1,37 – 0,80; Sub H= -0,85 – -1,50). En este análisis, la mayoría de las ASVs diferencialmente abundantes se encontraron en el grupo de periimplantitis (86 ASVs, 28,67% vs. 53 ASVs, 17,67%).

Principales ASVs con abundancia diferencial entre grupos de estudio

Los taxones específicos fuertemente asociados (clasificación taxonómica a nivel especie definida, tamaño del efecto $<-1,00$ o $>1,00$) a un grupo de estudio determinado en el análisis de abundancia diferencial están detallados en la Tabla 4.

Así, las principales ASVs asociadas a la salud periimplantaria fueron: *Cutibacterium acnes*-AV721, *Desulfobulbus* HMT041-AV149, *Escherichia coli*-AV116, *Gemella haemolysans*-AV26, *Klebsiella aerogenes*-AV1668, *Mogibacterium timidum*-AV640, *Prevotella pallens*-AV2498, *Ralstonia pickettii*-AV2863, *Rothia aerea*-AV6, *Rothia mucilaginosa*-AV48, *Streptococcus oralis dentisani*-AV320, *Streptococcus sanguinis*-AV228 y AV392, y *Streptococcus vestibularis*-AV27. En contraste, entre los taxones relacionados con la periimplantitis destacaron: *Anaerolineae* [G-1] *bacterium* HMT439-AV291, *Fretibacterium fastidiosum*-AV97 y *Pseudoramibacter alactolyticus*-AV550.

En el análisis comparativo entre los grupos periimplantarios y periodontales en condiciones de salud homólogas, únicamente dos ASVs: *Granulicatella adiacens*-AV13 y *Streptococcus oralis dentisani*-AV1; mostraron una asociación significativa y concurrente con la salud subgingival en implantes y dientes.

Finalmente, *Prevotella oris*-AV1007 destacó como ASV afín al nicho subgingival periimplantario. En la comparación entre implantes sanos y enfermos, este taxón se asoció significativamente con la salud. Sin embargo, en el resto de comparativas entre grupos periimplantarios y periodontales, independientemente del estado de salud, *Prevotella oris*-AV1007 mostró una asociación consistente con los grupos periimplantarios.

Tabla 4. Principales ASVs con abundancia diferencial entre los grupos de estudio.

ASVid	Género	Especie	ASV	Imp H vs. Imp P	Imp H vs. Sub H	Imp P vs. Sub P	Imp H vs. Sub P	Imp P vs. Sub H
AV00206	Actinomyces	massiliensis	BTASV213424		-1.07			
AV00291	Anaerolineae [G-1]	bacterium HMT439	BTASV107527					1.07
AV00107	Bergeyella	sp.HMT322	BTASV089026					-1.20
AV00140	Capnocytophaga	leadbetteri	unclassified					-1.04
AV00103	Cardiobacterium	hominis	BTASV158475			-1.05		-1.24
AV00102	Corynebacterium	durum	BTASV140751					-1.04
AV00721	Cutibacterium	acnes	unclassified		1.05		1.66	
AV00149	Desulfobulbus	sp. HMT041	unclassified		1.09			
AV00116	Escherichia	coli	BTASV133996	-1.02	1.14		1.67	
AV00097	Fretibacterium	fastidiosum	unclassified					1.03
AV00011	Fusobacterium	periodonticum	BTASV066878					-1.10
AV00026	Gemella	haemolysans	unclassified				1.43	
AV00136	Gemella	morbilloorum	unclassified					-1.07
AV00013	Granulicatella	adiacens	unclassified	-1.38				-1.50
AV00003	Haemophilus	parainfluenzae	unclassified					-1.19
AV00046	Haemophilus	parainfluenzae	unclassified					-1.11
AV00066	Kingella	oralis	BTASV175208			-1.05		-1.28
AV01668	Klebsiella	aerogenes	unclassified		1.06		1.03	
AV00640	Mogibacterium	timidum	BTASV011251		1.06			
AV00025	Prevotella	nigrescens	unclassified				-1.22	
AV01007	Prevotella	oris	BTASV085459	-1.19	2.39	1.01	2.36	1.04
AV02498	Prevotella	pallens	unclassified		1.22		1.18	
AV00550	Pseudoramibacter	alactolyticus	BTASV124199					1.37
AV02863	Ralstonia	pickettii	unclassified		1.50		1.47	
AV00006	Rothia	aeria	BTASV063887	-1.14				
AV00002	Rothia	dentocariosa	BTASV138915		-1.20			
AV00048	Rothia	mucilaginoso	unclassified	-1.12			1.53	
AV00001	Streptococcus	oralis subsp. dentisani clade 058	BTASV016027	-1.30			1.15	-1.07
AV00320	Streptococcus	oralis subsp. dentisani clade 058	unclassified				1.77	
AV00228	Streptococcus	sanguinis	unclassified				1.05	
AV00392	Streptococcus	sanguinis	unclassified				1.02	
AV00027	Streptococcus	vestibularis	BTASV004875	-1.04	1.01		1.78	
AV00141	Tannerella	sp.HMT286	unclassified			-1.16		

En la tabla se muestran las ASVs específicas con abundancia diferencial fuertemente asociadas (es decir, clasificación taxonómica a nivel especie definida y tamaño del efecto $<-1,00$ o $>1,00$) a un grupo de estudio determinado en todas las comparativas dos a dos. El color de las celdas que contienen el valor del tamaño del efecto indica el grupo con mayor abundancia. Las celdas azules se asocian a la salud periimplantaria, las rojas a la periimplantitis, las verdes a la salud periodontal y las naranjas a la periodontitis.

ASV: variante de secuencia de amplicón; ASVid: identificador de variante de secuencia de amplicón; Imp H: salud periimplantaria; Imp P: periimplantitis; Sub H: salud periodontal; Sub P: periodontitis.

3.5 Análisis de modelado predictivo

El modelo predictivo diseñado para distinguir la salud periimplantaria de la periimplantitis requirió un total de 50 ASVs y obtuvo un valor de AUC de 0,87, con exactitud del 80,95%, sensibilidad del 92,06% y especificidad del 69,84%. Además, demostró un VPP del 75,32% y VPN del 89,80%. La curva ROC y el plano de predicción de muestras del modelo predictivo se muestra en la Figura 3.

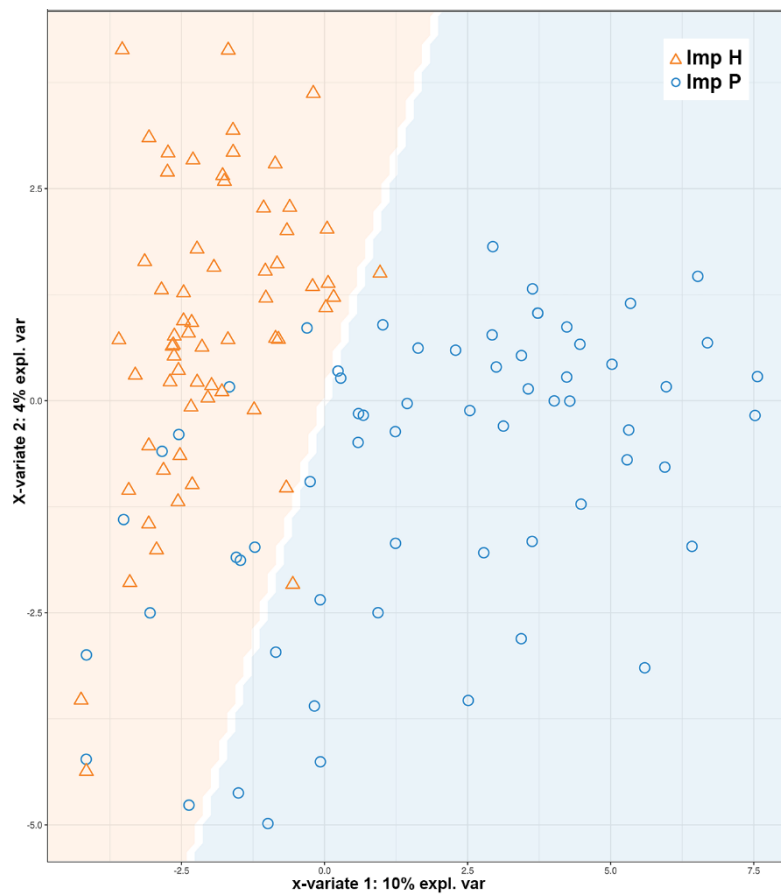
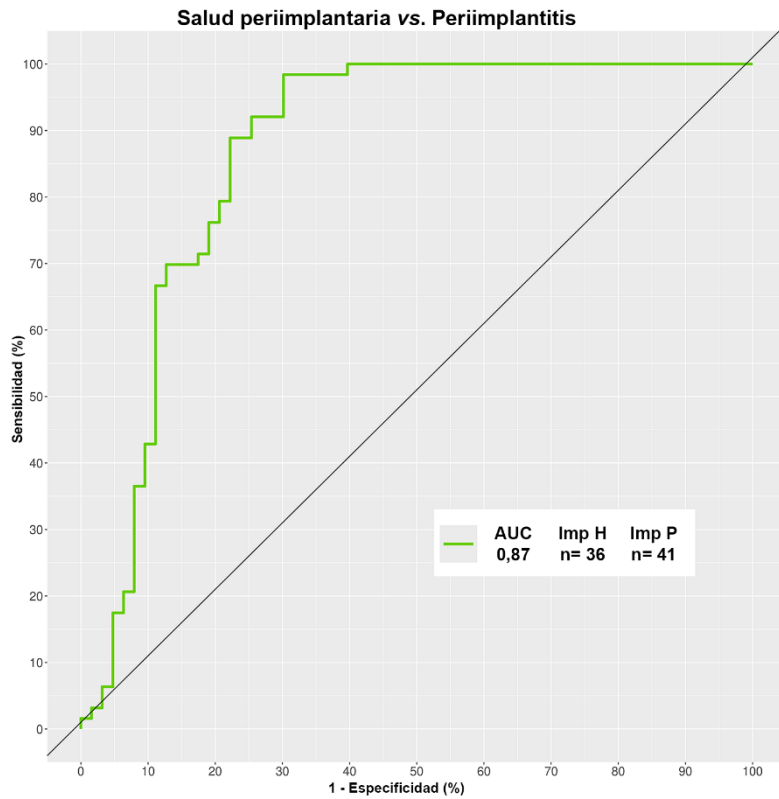


Figura 3. Curva ROC y plano de predicción de muestras del modelo predictivo para distinguir la salud periimplantaria de la periimplantitis.

AUC: área bajo la curva; Imp H: salud periimplantaria; Imp P: periimplantitis; n: tamaño muestral; Sub H: salud periodontal; Sub P: periodontitis.

ASVs predictoras de salud periimplantaria y periimplantitis

La Tabla 5 presenta todas las ASVs que formaron parte del modelo predictivo para distinguir entre salud periimplantaria y periimplantitis. Para identificar las predictoras más relevantes, seguimos un criterio análogo al empleado en los análisis de abundancia diferencial, centrándonos en aquellas ASVs cuya asignación taxonómica a nivel de especie estaba definida. En este contexto, *E. coli*-AV116, *P. oris*-AV1007, *Fusobacterium periodonticum*-AV298 y *Sacchari* BTASV095748-AV477 destacaron, en el orden mencionado, como principales predictoras de salud periimplantaria por sus valores de contribución al modelo ($<-0,10$).

En contraste, las principales ASVs predictoras de periimplantitis (valor de contribución al modelo $>0,10$) fueron, en orden: *Fusobacterium nucleatum vincentii*-AV204 y AV200, *Porphyromonas gingivalis*-AV171, *Desulfobulbus* HMT041-AV1193, *Sphingomonas echinoides*-AV306, *Prevotella nigrescens*-AV25, *Prevotella pleuritidis*-AV153, *Tannerella forsythia*-AV2516, *Campylobacter gracilis*-AV41 y *Treponema denticola*-AV38.

Tabla 5. ASVs predictoras de salud periimplantaria y periimplantitis.

ASVid	Género	Especie	ASV	Peso en modelo
AV00435	Bacteroidetes [G-5]	bacterium HMT511	BTASV114407	0.07
AV00041	Campylobacter	gracilis	BTASV155368	0.11
AV01193	Desulfobulbus	sp. HMT041	unclassified	0.18
AV00915	Enterobacterales unclassified	unclassified	unclassified	-0.18
AV00116	Escherichia	coli	BTASV133996	-0.34
AV00010	Fusobacterium	nucleatum subsp. vincentii	unclassified	0.10
AV00059	Fusobacterium	nucleatum subsp. vincentii	BTASV066150	0.09
AV00077	Fusobacterium	nucleatum subsp. vincentii	unclassified	0.10
AV00098	Fusobacterium	nucleatum subsp. vincentii	unclassified	0.05
AV00200	Fusobacterium	nucleatum subsp. vincentii	unclassified	0.20
AV00204	Fusobacterium	nucleatum subsp. vincentii	unclassified	0.24
AV00298	Fusobacterium	periodonticum	unclassified	-0.15
AV00060	Fusobacterium	unclassified	unclassified	0.12
AV00096	Fusobacterium	unclassified	unclassified	0.27
AV00378	Fusobacterium	unclassified	unclassified	0.11
AV00517	Fusobacterium	unclassified	unclassified	0.27
AV02782	Fusobacterium	unclassified	unclassified	-0.02
AV00440	Gammaproteobacteria unclassified	unclassified	unclassified	-0.21
AV01668	Klebsiella	aerogenes	unclassified	-0.06
AV00067	Lautropia	mirabilis	unclassified	-0.09
AV00251	Leptotrichia	sp. HMT225	BTASV075684	-0.07
AV00295	Neisseria	unclassified	unclassified	-0.13
AV00272	Olsenella	sp. HMT807	BTASV198001	0.01
AV00670	Olsenella	uli	BTASV011234	0.03
AV00021	Parvimonas	sp. HMT110	unclassified	0.00
AV00008	Porphyromonas	gingivalis	BTASV154369	0.10
AV00104	Porphyromonas	gingivalis	unclassified	0.07
AV00171	Porphyromonas	gingivalis	unclassified	0.23
AV02858	Porphyromonas	gingivalis	BTASV154369	0.02
AV00391	Prevotella	denticola	unclassified	0.06
AV00025	Prevotella	nigrescens	unclassified	0.14
AV01007	Prevotella	oris	BTASV085459	-0.18
AV00153	Prevotella	pleuritidis	unclassified	0.14
AV00550	Pseudoramibacter	alactolyticus	BTASV124199	0.09
AV00040	Rothia	mucilaginoso	unclassified	-0.02
AV00477	Sacchari	BTASV095748	unclassified	-0.13
AV00397	Selenomonas	noxia	unclassified	-0.03
AV00988	Sphingomonadaceae unclassified	unclassified	unclassified	-0.11
AV00306	Sphingomonas	echinoides	unclassified	0.15
AV00004	Streptococcus	unclassified	unclassified	-0.01
AV00071	Streptococcus	unclassified	unclassified	-0.14
AV00121	Streptococcus	unclassified	unclassified	-0.02
AV00220	Streptococcus	unclassified	unclassified	-0.03
AV00263	Streptococcus	unclassified	unclassified	-0.02
AV00681	Streptococcus	unclassified	unclassified	-0.17
AV02516	Tannerella	forsythia	unclassified	0.13
AV00038	Treponema	denticola	BTASV138814	0.10
AV00195	Treponema	unclassified	unclassified	0.34
AV00131	Veillonella	dispar	unclassified	-0.01
AV00216	Veillonella	dispar	unclassified	-0.05

La tabla indica el peso de cada una de las variables predictoras en el modelo predictivo. Aquellas ASVs con valores más próximos a 1,00 o -1,00 muestran un peso mayor. Asimismo, las celdas están coloreadas según la condición predicha por cada ASV determinada. Así, el azul corresponde a la salud periimplantaria y el rojo a la periimplantitis. ASV: variante de secuencia de amplicón; ASVid: identificador de variante de secuencia de amplicón.

4. DISCUSIÓN

Hasta la fecha, solo un estudio de secuenciación ARNr 16S ha abordado el microbioma subgingival en salud periimplantaria y periimplantitis desde la diversidad y el modelado predictivo (16). Sin embargo, este trabajo presenta limitaciones metodológicas. En primer lugar, utiliza unidades taxonómicas operativas, un enfoque que puede agrupar variantes biológicamente distintas bajo un mismo umbral arbitrario y cuya dependencia del algoritmo y del tamaño muestral dificulta la comparabilidad (18). Métodos actuales como las ASVs ofrecen mayor resolución y precisión taxonómica (40).

Respecto al análisis de modelado, las variables microbianas y del huésped se seleccionaron por correlación con parámetros clínicos, sin considerar la dependencia entre ellas ni asegurar la inclusión de características relevantes (17). Además, los taxones se clasificaron en el nivel género, lo cual limita la interpretación, ya que distintas especies de un mismo género pueden asociarse a estados orales opuestos (41). Finalmente, la combinación de variables procedentes de técnicas heterogéneas también complica la aplicación clínica del modelo de clasificación obtenido.

Dadas las limitaciones anteriores, el presente estudio se enfocó en caracterizar la diversidad del microbioma subgingival en salud y enfermedad periimplantaria, y en compararla con la correspondiente a la salud periodontal y la periodontitis. Asimismo, desarrollamos modelos predictivos de periimplantitis basados en datos de secuencias Illumina V3–V4 de estudios previos, analizados con un protocolo bioinformático y estadístico homogéneo siguiendo las mejores prácticas para secuenciación 16S (18), análisis de diversidad y modelado predictivo (19).

4.1 Análisis de alfa-diversidad

En la comparativa entre salud periimplantaria y periimplantitis, a diferencia de lo reportado previamente, donde no se encontraron diferencias (14,16,42) o se describió una mayor riqueza en periimplantitis (15,43); observamos un mayor número de ASVs en la condición sana. El carácter novedoso de nuestros hallazgos presenta coherencia biológica, ya que la pérdida de riqueza asociada al estado inflamatorio podría ser el reflejo de un entorno menos favorable para la diversidad microbiana en presencia de periimplantitis. Así, las condiciones locales dificultarían la coexistencia de múltiples especies y favorecerían la expansión selectiva de patobiontes.

Por otro lado, la literatura también recoge observaciones dispares respecto a la alfa-

diversidad subgingival entre los nichos periimplantario y periodontal. En nuestro estudio, la riqueza y diversidad microbianas fueron sistemáticamente menores en el entorno periimplantario, tanto en condiciones de salud homólogas entre nichos, como entre situaciones opuestas. Estos hallazgos contrastan con los descritos por otros autores, quienes no reportan diferencias (42) o describen una mayor riqueza (44) y diversidad (45) en la periimplantitis que en la periodontitis.

En base a nuestros resultados, la escasa vascularización y distinta inserción colágena en el entorno periimplantario (46), podrían explicar su dificultad para mantener comunidades microbianas complejas como las del entorno periodontal. Específicamente, la menor alfa-diversidad que observamos en la periimplantitis respecto a la periodontitis sugiere un ecosistema con una disbiosis más marcada en el entorno artificial que en el natural.

4.2 Análisis de la estructura de las comunidades microbianas

Hasta la fecha, se han reportado diferencias estructurales en la composición microbiana entre salud periimplantaria y periimplantitis (16,43), así como entre salud periodontal y periodontitis (47,48). No obstante, por primera vez en la literatura, nuestro estudio identificó diferencias significativas en todas las comparaciones por pares entre las distintas condiciones de salud y los nichos periimplantario y periodontal.

La marcada variabilidad composicional observada parece apoyar que la configuración del microbioma subgingival se debe a una influencia conjunta del estado clínico (salud o enfermedad) y del tipo de tejido (periimplantario o periodontal).

4.3 Análisis de abundancia diferencial

Las investigaciones previas sobre el microbioma subgingival periimplantario utilizaron LEfSE (16,44,49) o DESeq2 (42,50) para el análisis de abundancia diferencial. Estas herramientas, al igual que otros enfoques analíticos como la aplicación de pruebas estadísticas sin realizar transformaciones logarítmicas (14,15), no consideran la composicionalidad de los datos del microbioma (51). Además, son sensibles al exceso de ceros, lo que conlleva elevadas tasas de falsos positivos (51). En este trabajo, realizamos una transformación CLR que nos permitió tener en cuenta la composicionalidad y la sobredispersión inherentes a los datos del microbioma (52).

La comparación entre salud periimplantaria y periimplantitis evidenció una de las

separaciones microbianas más marcadas del estudio en términos de abundancia diferencial (87 ASVs), con más de un tercio de las ASVs diferencialmente abundantes mostrando tamaños del efecto elevados (hasta $\pm \sim 1,35$). Además, el mayor número de taxones asociados a la condición sana (52 vs. 35 ASVs) apoya la hipótesis de que la transición a la enfermedad implica, más que la aparición de nuevos patobiontes, la pérdida de microorganismos favorecedores del equilibrio saludable.

Por otro lado, al comparar los perfiles microbianos periimplantarios con los periodontales, se observó que las diferencias entre las condiciones de salud (Imp H vs. Sub H) fueron más pronunciadas que entre sus respectivas situaciones patológicas (Imp P vs. Sub P), tanto en el número de ASVs con abundancia diferencial (76 vs. 29) como en los tamaños del efecto observados (valor máximo: 2,80 vs. -1,16). La comparativa de estos cuatro nichos en un mismo estudio nos permite proponer una conclusión novedosa en la literatura y es que, en estado de eubiosis, los ecosistemas subgingivales dentales e implantarios presentan una mayor diferenciación microbiana, mientras que en contextos de disbiosis, los perfiles bacterianos tienden a converger, reflejando un patrón más homogéneo de enfermedad.

A mayores de lo anterior, las comparaciones de nicho periimplantario-periodontal en condiciones de salud opuestas también mostraron unos altos niveles de divergencia microbiana. Estos contrastes probablemente reflejan la influencia combinada del estado clínico (salud vs. patología) y del tipo de superficie (implante vs. diente), poniendo de manifiesto cómo ambos factores contribuyen conjuntamente a moldear la composición del microbioma subgingival.

4.4 Análisis de modelado predictivo

Nuestro estudio aplica una tendencia analítica emergente en el campo de la medicina personalizada: el desarrollo de modelos predictivos basados en la identificación de biomarcadores microbianos específicos (53). Este enfoque no solo permite avanzar hacia un diagnóstico de precisión, sino que también facilita el diseño de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas individualizadas y más eficaces.

Hasta el momento, los modelos predictivos descritos en la literatura para el diagnóstico de la periimplantitis han combinado variables microbianas subgingivales con biomarcadores del huésped, logrando valores de AUC similares al obtenido en nuestro estudio (0,85) (16). Sin embargo, integrar datos obtenidos mediante técnicas de

laboratorio diferentes en un mismo modelo conlleva ciertas limitaciones para su aplicación clínica, como el aumento de los costes, la necesidad de recursos técnicos adicionales y una mayor complejidad en el manejo y análisis de los datos.

Según la literatura especializada en diagnóstico predictivo (54,55), nuestro modelo alcanzó una capacidad discriminativa excelente ($80\% \geq \text{AUC} \leq 90\%$) utilizando únicamente 50 ASVs y, aunque la especificidad para clasificar correctamente a individuos con salud periimplantaria fue buena ($\sim 70\% - 80\%$), la sensibilidad para detectar casos de periimplantitis fue sobresaliente, superando el 90%. Estos resultados son especialmente relevantes en entornos clínicos donde la prioridad es evitar falsos negativos e intervenir de forma oportuna en pacientes en riesgo. Por tanto, el modelo propuesto se perfila como una herramienta prometedora para la detección temprana de la periimplantitis, con potencial para integrarse en la práctica clínica sin añadir una carga tecnológica excesiva.

4.5 Señales microbianas asociadas al microbioma subgingival en salud periimplantaria y periimplantitis

Las observaciones obtenidas mediante el análisis de abundancia diferencial revelan asociaciones interesantes entre ciertas especies bacterianas y las condiciones periimplantarias y periodontales. Específicamente, *G. adiacens* y *S. oralis dentisani* se asociaron con salud en ambos contextos. Si bien ambas especies ya habían sido relacionadas con salud oral de forma independiente en estudios previos, *G. adiacens* con salud periimplantaria (16) y *S. oralis dentisani* con salud periodontal (20), este es el primer estudio que reporta su asociación conjunta. Este hallazgo sugiere que ambas especies podrían formar parte de un perfil microbiano común característico de la salud subgingival, independientemente del tipo de superficie (implante o diente natural). Asimismo, a través de este enfoque analítico pudimos confirmar la asociación entre *F. fastidiosum* (16,44) y *P. alactolyticus* (44) y la periimplantitis.

Por el contrario, identificamos dos ASVs de *S. sanguinis* asociadas a la salud periimplantaria, lo cual contrasta con lo reportado por Nie *et al.* (15) quienes relacionaron dicha especie con la periimplantitis. Además, *P. oris-AV1007* mostró una asociación contradictoria al encontrarse vinculada tanto a la salud periimplantaria como a la periimplantitis. Si bien esta dualidad podría indicar una afinidad ecológica específica por el nicho subgingival periimplantario, nuestro grupo ya ha documentado anteriormente que algunos ASVs pueden asociarse a condiciones de salud opuestas en los análisis de

abundancia diferencial (20). Este fenómeno, sin embargo, no se replica en los modelos predictivos, los cuales proporcionan una visión más coherente de los taxones implicados en salud y enfermedad (20).

En este sentido, nuestro estudio identificó por primera vez a *E. coli*, *F. periodonticum*, *P. oris* y *S. BTASV095748* como variables predictoras de salud periimplantaria. Entre estas, *E. coli* es comúnmente reconocida por su implicación en enfermedades gastrointestinales (56), aunque también ha sido detectada en el entorno periimplantario (57), mientras que las tres especies restantes han sido descritas como comensales potencialmente oportunistas (58,59,60). Estos hallazgos sugieren que el potencial patogénico de los taxones anteriores podría estar modulado por la composición de la comunidad microbiana circundante en el contexto de salud periimplantaria.

En contraste, entre los predictores de periimplantitis identificamos varios patobiontes tradicionalmente vinculados a la periodontitis, como *C. gracilis*, *D. HMT041*, *F. nucleatum vincentii*, *P. gingivalis*, *P. nigrescens*, *T. forsythia* y *T. denticola* (61,62). Asimismo, reportamos ASVs correspondientes a especies menos comúnmente asociadas con el entorno oral, como *P. pleuritidis* (63) y *S. echinoides* (64), cuyo papel en la disbiosis periimplantaria merece una exploración más profunda.

5. CONCLUSIONES

El microbioma subgingival en condiciones de salud periimplantaria presenta una mayor riqueza que en casos de periimplantitis. En general, la alfa-diversidad de la placa subgingival es menor en el entorno periimplantario que en el periodontal, tanto en la salud como en la enfermedad. Además, la estructura de los microbiomas varía significativamente entre los grupos estudiados.

En términos de abundancia de taxones, el microbioma subgingival mostró diferencias marcadas entre la salud periimplantaria y la periimplantitis. Asimismo, las divergencias observadas entre la salud periimplantaria y la periodontal (estado de eubiosis) son más pronunciadas que aquellas observadas entre sus respectivas situaciones patológicas (disbiosis).

Finalmente, el modelo predictivo desarrollado demuestra una capacidad excelente para discriminar entre salud periimplantaria y periimplantitis, con una sensibilidad sobresaliente y una especificidad buena. En conjunto, estos hallazgos respaldan el potencial del microbioma subgingival como herramienta diagnóstica de precisión para la evaluación del estado clínico periimplantario.

Financiación del estudio

El presente estudio pertenece al proyecto “*Characterisation of the subgingival microbiome of peri-implantitis: and its potential as a predictive diagnostic tool*” financiado por Galimplant, Dental Implant System (referencia de proyecto 2025-CE011).

BIBLIOGRAFÍA

1. Frencken JE, Sharma P, Stenhouse L, Green D, Lavery D, Dietrich T. Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis - a comprehensive review. *J Clin Periodontol*. 2017 Jul;44 Suppl 18:S94–105. doi: 10.1111/jcpe.12677.
2. World Health Organization. Oral health [Internet]. Geneva: WHO; [cited 2025 Apr 20]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>
3. Guillaume B. Dental implants: a review. *Morphologie*. 2016 Jun;100(331):189–98. doi: 10.1016/j.morpho.2016.02.002.
4. Cui Z, Wang P, Gao W. Microbial dysbiosis in periodontitis and peri-implantitis: pathogenesis, immune responses, and therapeutic. *Front Cell Infect Microbiol*. 2025;15:1517154. doi: 10.3389/fcimb.2025.1517154.
5. Diaz P, Gonzalo E, Villagra LJG, Miegimolle B, Suarez MJ. What is the prevalence of peri-implantitis? A systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health*. 2022 Oct;22(1):449. doi: 10.1186/s12903-022-02493-8.
6. Alves CH, Russi KL, Rocha NC, Bastos F, Darrieux M, Parisotto TM, et al. Host-microbiome interactions regarding peri-implantitis and dental implant loss. *J Transl Med*. 2022 Nov;20(1):425. doi: 10.1186/s12967-022-03636-9.
7. Botero JE, González AM, Mercado RA, Olave G, Contreras A. Subgingival microbiota in peri-implant mucosa lesions and adjacent teeth in partially edentulous patients. *J Periodontol*. 2005 Sep;76(9):1490–5. doi: 10.1902/jop.2005.76.9.1490.
8. Shibli JA, Melo L, Ferrari DS, Figueiredo LC, Favari M, Feres M. Composition of supra- and subgingival biofilm of subjects with healthy and diseased implants. *Clin Oral Implants Res*. 2008 Oct;19(10):975–82. doi: 10.1111/j.1600-0501.2008.01566.x.
9. Gürlek Ö, Gümüş P, Nile CJ, Lappin DF, Buduneli N. Biomarkers and bacteria around implants and natural teeth in the same individuals. *J Periodontol*. 2017 Aug;88(8):752–61. doi: 10.1902/jop.2017.160751.
10. Willis JR, Gabaldón T. The human oral microbiome in health and disease: from sequences to ecosystems. *Microorganisms*. 2020 Feb;8(2):308. doi: 10.3390/microorganisms8020308.
11. Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev*. 1987 Jun;51(2):221–71. doi: 10.1128/mr.51.2.221-271.1987.

12. Rodicio MdR, Mendoza MdC. Identification of bacteria through 16S rRNA sequencing: principles, methods and applications in clinical microbiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 Apr;22(4):238–45. doi: 10.1157/13059055.
13. Philip J, Buijs MJ, Pappalardo VY, Crielaard W, Brandt BW, Zaura E. The microbiome of dental and peri-implant subgingival plaque during peri-implant mucositis therapy: a randomized clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2022 Jan;49(1):28–38. doi: 10.1111/jcpe.13566.
14. Jung HJ, Lee W. Difference in microbiome compositions of healthy peri-implant sulcus and peri-implantitis sulcus from the same patient. *Heliyon*. 2023 Sep;9(9):e20303. doi: 10.1016/j.heliyon.2023.e20303.
15. Nie J, Zhang Q, Zheng H, Xu LX, Wang XY, Chen F. Pyrosequencing of the subgingival microbiome in peri-implantitis after non-surgical mechanical debridement therapy. *J Periodontal Res*. 2020 Apr;55(2):238–46. doi: 10.1111/jre.12708.
16. Song L, Jiang J, Li J, Zhou C, Chen Y, Lu H, et al. The characteristics of microbiome and cytokines in healthy implants and peri-implantitis of the same individuals. *J Clin Med*. 2022 Oct;11(19):5817. doi: 10.3390/jcm11195817.
17. Borah K, Das HS, Seth S, Mallick K, Rahaman Z, Mallik S. A review on advancements in feature selection and feature extraction for high-dimensional NGS data analysis. *Funct Integr Genomics*. 2024 Aug 19;24(5):139. doi: 10.1007/s10142-024-01415-x.
18. Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Blanco-Pintos T, Tomás I. Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies: from primer selection to advanced data analysis. *Mol Oral Microbiol*. 2023 Oct;38(5):347–99. doi: 10.1111/omi.12434.
19. Steyerberg EW. *Clinical prediction models: a practical approach to development, validation, and updating*. 2nd ed. Cham: Springer; 2019. doi: 10.1007/978-3-030-1.
20. Regueira-Iglesias A, Suárez-Rodríguez B, Blanco-Pintos T, Relvas M, Alonso-Sampedro M, Balsa-Castro C, Tomás I. The salivary microbiome as a diagnostic biomarker of periodontitis: a 16S multi-batch study before and after the removal of batch effects. *Front Cell Infect Microbiol*. 2024 Jul 12;14:1405699. doi: 10.3389/fcimb.2024.1405699
21. Regueira Iglesias A. Limitations of 16S rRNA gene as phylogenetic marker: a large-scale meta-omics analysis of plaque microbiota in periodontal diseases [doctoral

- thesis]. Santiago de Compostela: Universidade de Santiago de Compostela; 2022. 472 p. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=307983>
22. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*. 2010 Oct;26(19):2460–1. doi: 10.1093/bioinformatics/btq461.
 23. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Dec;75(23):7537–41. doi: 10.1128/AEM.01541-09.
 24. Escapa IF, Huang Y, Chen T, Lin M, Kokaras A, Dewhirst FE, et al. Construction of habitat-specific training sets to achieve species-level assignment in 16S rRNA gene datasets. *Microbiome*. 2020 May;8(1):65. doi: 10.1186/s40168-020-00841-w.
 25. Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*. 2016 Oct;4:e2584. doi: 10.7717/peerj.2584.
 26. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, et al. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol*. 2004;5(10):R80. doi: 10.1186/gb-2004-5-10-r80.
 27. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. Version 4.4.1 [computer software]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2024. Disponible en: <https://www.R-project.org/>.
 28. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One*. 2013 Apr;8(4):e61217. doi: 10.1371/journal.pone.0061217.
 29. Lahti L, Shetty S. Tools for microbiome analysis in R. *Microbiome package*. Version 1.26.0 [computer software]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2019. Disponible en: <http://microbiome.github.com/microbiome>.
 30. Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao KA. mixOmics: an R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLoS Comput Biol*. 2017 Nov;13(11):e1005752. doi: 10.1371/journal.pcbi.1005752.
 31. Anderson MJ. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral Ecol*. 2001;26:32–46. doi: 10.1111/j.1442-9993.2001.01070.pp.x.
 32. Oksanen J, Simpson G, Blanchet F, et al. vegan: community ecology package. R package. Version 2.6-8 [computer software]. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2024. Disponible en: <https://cran.r-project.org>.

33. MuToss Coding Team, Blanchard G, Dickhaus T, Hack N, Konietzschke F, Rohmeyer K, et al. mutoss: unified multiple testing procedures. R package [software]. 2023. Disponible en: <https://cran.r-project.org/package=mutoss>
34. Torchiano M. Effsize: efficient effect size computation. R package [software]. 2020. Disponible en: <https://CRAN.R-project.org/package=effsize>.
35. Lê Cao KA, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics*. 2011;12:253. doi: 10.1186/1471-2105-12-253.
36. Scrucca L. GA: a package for genetic algorithms in R. *J Stat Softw*. 2013;53(4):1–37. doi: 10.18637/jss.v053.i04.
37. Kuhn M. Building predictive models in R using the caret package. *J Stat Softw*. 2008;28(5):1–26. doi: 10.18637/jss.v028.i05.
38. Saito T, Rehmsmeier M. Precrec: fast and accurate precision-recall and ROC curve calculations in R. *Bioinformatics*. 2017;33(1):145–7. doi: 10.1093/bioinformatics/btw570.
39. Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol*. 2018 Jun;89 Suppl 1:S159–72. doi: 10.1093/bib/bbac622.
40. Nearing JT, Douglas GM, Comeau AM, Langille MGI. Denoising the denoisers: an independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ*. 2018;6:e5364. doi: 10.7717/peerj.5364.
41. Relvas M, Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Salazar F, Pacheco JJ, Cabral C, et al. Relationship between dental and periodontal health status and the salivary microbiome: bacterial diversity, co-occurrence networks and predictive models. *Sci Rep*. 2021;11(1):929. doi: 10.1038/s41598-020-79875-x.
42. Yu XL, Chan Y, Zhuang L, Lai HC, Lang NP, Leung WK, et al. Intra-oral single-site comparisons of periodontal and peri-implant microbiota in health and disease. *Clin Oral Implants Res*. 2019;30(8):760–76. doi: 10.1111/clr.13459.
43. Gao X, Zhou J, Sun X, Li X, Zhou Y. Diversity analysis of subgingival microbial bacteria in peri-implantitis in Uyghur population. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(5):e9774. doi: 10.1097/MD.0000000000009774.
44. Kim HJ, Ahn DH, Yu Y, Han H, Kim SY, Joo JY, et al. Microbial profiling of peri-implantitis compared to the periodontal microbiota in health and disease using 16S

- rRNA sequencing. *J Periodontal Implant Sci.* 2023;53(1):69–84. doi: 10.5051/jpis.2202080104.
45. Komatsu K, Shiba T, Takeuchi Y, Watanabe T, Koyanagi T, Nemoto T, Shimogishi M, Shibasaki M, Katagiri S, Kasugai S, Iwata T. Discriminating microbial community structure between peri-implantitis and periodontitis with integrated metagenomic, metatranscriptomic, and network analysis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020 Dec 11;10:596490. doi: 10.3389/fcimb.2020.596490.
 46. Alexander R, Liu X. Soft tissue integration around dental implants: A pressing priority. *Biomaterials.* 2025 Jun 9;324:123491. doi: 10.1016/j.biomaterials.2025.123491.
 47. Cai Z, Lin S, Hu S, Zhao L. Structure and function of oral microbial community in periodontitis based on integrated data. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Jun;11:663756. doi: 10.3389/fcimb.2021.663756.
 48. Abusleme L, Hoare A, Hong BY, Diaz PI. Microbial signatures of health, gingivitis, and periodontitis. *Periodontol 2000.* 2021 Jun;86(1):57-78.
 49. Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011 Jun;12(6):R60. doi: 10.1186/gb-2011-12-6-r60.
 50. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014;15(12):550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
 51. Gloor GB, Macklaim JM, Pawlowsky-Glahn V, Egozcue JJ. Microbiome datasets are compositional: and this is not optional. *Front Microbiol.* 2017 Nov;8:2224. doi: 10.3389/fmicb.2017.02224.
 52. Wang Y, Lê Cao K. Managing batch effects in microbiome data. *Brief Bioinform.* 2020 Dec;21(6):1954-1970. doi: 10.1093/bib/bbz105.
 53. Hernández Medina R, Kutuzova S, Nielsen KN, et al. Machine learning and deep learning applications in microbiome research. *ISME Commun.* 2022;2(1):98. doi: 10.1038/s43705-022-00182-9.
 54. Hosmer DJ, Lemeshow S, Sturdivant R. *Applied Logistic Regression.* 3rd ed. Hoboken (NJ): John Wiley & Sons; 2013. 528 p.
 55. De Luca Canto G, Pachêco-Pereira C, Aydinov S, Major PW, Flores-Mir C, Gozal D. Diagnostic capability of biological markers in assessment of obstructive sleep

- apnea: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Sleep Med*. 2015;11(1):27-36. doi: 10.5664/jcsm.4358.
56. Kitamoto S, Nagao-Kitamoto H, Hein R, Schmidt TM, Kamada N. The bacterial connection between the oral cavity and the gut diseases. *J Dent Res*. 2020 Sep;99(9):1021-1029. doi: 10.1177/0022034520924633.
57. Bessa LJ, Egas C, Botelho J, Machado V, Alcoforado G, Mendes JJ, Alves R. Unveiling the Resistome Landscape in Peri-Implant Health and Disease. *J Clin Med*. 2025 Jan 31;14(3):931. doi: 10.3390/jcm14030931. PMID: 39941602; PMCID: PMC11818638.
58. Slots J, Potts TV, Mashimo PA. *Fusobacterium periodonticum*, a new species from the human oral cavity. *J Dent Res*. 1983 Sep;62(9):960-963. doi: 10.1177/00220345830620090901.
59. Könönen E, Fteita D, Gursoy UK, Gursoy M. *Prevotella* species as oral residents and infectious agents with potential impact on systemic conditions. *J Oral Microbiol*. 2022 May 26;14(1):2079814. doi: 10.1080/20002297.2022.2079814.
60. Bor B, Bedree JK, Shi W, McLean JS, He X. *Saccharibacteria* (TM7) in the human oral microbiome. *J Dent Res*. 2019 May;98(5):500-509. doi: 10.1177/0022034519831671.
61. Teles R, Teles F, Frias-Lopez J, Paster B, Haffajee A. Lessons learned and unlearned in periodontal microbiology. *Periodontol 2000*. 2013 Jun;62(1):95-162. doi: 10.1111/prd.12010. PMID: 23574465; PMCID: PMC3912758.
62. Lafaurie GI, Neuta Y, Ríos R, Pacheco-Montealegre M, Pianeta R, Castillo DM, et al. Differences in the subgingival microbiome according to stage of periodontitis: A comparison of two geographic regions. *PLoS One*. 2022 Aug 23;17(8):e0273523. doi: 10.1371/journal.pone.0273523.
63. Bell PT, Baird T, Goddard J, Olagoke OS, Burke A, Subedi S, et al. Evaluating the feasibility, sensitivity, and specificity of next-generation molecular methods for pleural infection diagnosis. *Microbiol Spectr*. 2025 Feb 4;13(2):e0196024. doi: 10.1128/spectrum.01960-24.
64. Eriksson K, Lundmark A, Delgado LF, Hu YOO, Fei G, Lee L, et al. Salivary microbiota and host-inflammatory responses in periodontitis affected individuals with and without rheumatoid arthritis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Mar 14;12:841139. doi: 10.3389/fcimb.2022.841139.