Universidad Católica de Santa María

Facultad de Odontología

Escuela Profesional de Odontología

Caracterización in silico del microbioma subgingival en periodontitis frente a salud periodontal mediante análisis secuenciación 16s rrna de la Human Oral Microbiome Database (HOMD)

Tesis presentada por:

Gutierrez Gomez, Erika Magally

ORCID: 0009-0007-8416-4895

Para optar el Título Profesional de Cirujano Dentista

Asesor:

Dr. Figueroa Banda, Rufo Alberto

ORCID: 0005-0023-3452-3543

Arequipa - Perú

2026

UCSM-ERP

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

ODONTOLOGIA

TITULACIÓN CON TESIS

DICTAMEN APROBACIÓN DE BORRADOR

Arequipa, 27 de Abril del 2026

Dictamen: 018225-C-EPO-2026

Visto el borrador del expediente 018225, presentado por:

2004800752 - GUTIERREZ GOMEZ ERIKA MAGALLY

Titulado:

CARACTERIZACIÓN IN SILICO DEL MICROBIOMA SUBGINGIVAL EN PERIODONTITIS FRENTE A SALUD PERIODONTAL MEDIANTE ANÁLISIS SECUENCIACIÓN 16S RRNA DE LA HUMAN ORAL MICROBIOME DATABASE (HOMD)

Nuestro dictamen es:

APROBADO

Titulo Profesional/Titulo de Segunda Especialidad/Grado Académico a optar:

CIRUJANO DENTISTA

29567523 - ROJAS VALENZUELA CHRISTIAN VICENTE
DICTAMINADOR

29594866 - ANAYA MUÑOZ LUIS ALFREDO
DICTAMINADOR

30963687 - VALDIVIA PINTO PATRICIA MARCELA
DICTAMINADOR

Caracterización in silico del microbioma subgingival en periodontitis frente a salud periodontal mediante análisis secuenciación 16s rrna de la Human Oral Microbiome Database (HOMD)

INFORME DE ORIGINALIDAD

15%	15%	6%	3%
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	www.scielo.org.mx Fuente de Internet	3%
2	titula.universidadeuropea.es Fuente de Internet	3%
3	tadeo.metarevistas.org Fuente de Internet	2%
4	scielo.isciii.es Fuente de Internet	2%
5	ve.scielo.org Fuente de Internet	2%
6	www.revistasocialfronteriza.com Fuente de Internet	2%
7	Submitted to Universidad Católica de Santa María Trabajo del estudiante	1%
8	repositorio.uap.edu.pe Fuente de Internet	1%
9	repositorio.udec.cl Fuente de Internet	1%

DEDICATORIA

Especialmente a Dios Padre por ser mi guía y luz, por darme fortaleza, sabiduría y salud necesarias para superar los desafíos y culminar esta meta académica.

A mis queridos padres les dedico con todo mi corazón este logro, por su motivación constante, por darme aliento y esperanza en todo este proceso.

A mis 3 grandes hermanos, porque siempre están presentes incondicionalmente en los buenos y malos momentos, me siento orgullosa por cada uno de ellos ya que lograron sus metas profesionales de igual manera con mucho sacrificio y esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi alma mater “Universidad Católica de Santa María” a mi querida “Facultad de Odontología” por abrirme las puertas de sus aulas y darme la oportunidad de formarme para ser un gran profesional. A los Drs. Miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis, por sus acotaciones y tiempo prestado. Deseo expresar mi más sincera gratitud a mi asesor, el Dr. Rufo Alberto Figueroa Banda, por su dirección experta, la confianza depositada en este proyecto desde el primer día, su visión fue fundamental para darle rigor a esta investigación. Asimismo, agradezco al Ing. Luis Fernando Rondan Villagra por su invaluable apoyo técnico y su disposición para guiarme en el uso de programas bioinformáticos, la recolección de datos , el análisis estadístico, por las horas de trabajo compartido, por su generosidad al compartir sus conocimientos, su ayuda facilitó enormemente el desarrollo del presente trabajo.

RESUMEN

Objetivo: Comparar la composición y diversidad del microbioma subgingival entre pacientes con periodontitis y personas con salud periodontal, mediante análisis computacional de secuencias 16S rRNA y anotación taxonómica basada en la Human Oral Microbiome Database (HOMD/eHOMD). Métodos: Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, transversal, descriptivo-comparativo de tipo in silico sobre un conjunto de 85 muestras subgingivales (45 con salud periodontal y 40 con periodontitis). Las abundancias de 26 géneros bacterianos, mapeados a la taxonomía eHOMD V16.03 (820 taxones HMT únicos), fueron analizadas en Python 3.10 (SciPy, scikit-learn). La diversidad alfa se cuantificó mediante los índices de Shannon, Simpson (1-D) y riqueza observada, y fue comparada entre grupos con la prueba U de Mann-Whitney. La diversidad beta se evaluó mediante distancia de Bray-Curtis, ordenación por Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y PERMANOVA (999 permutaciones). La abundancia diferencial se evaluó con la prueba U de Mann-Whitney con corrección por tasa de descubrimiento falso (FDR) de Benjamini-Hochberg. Se construyó un clasificador Random Forest con validación cruzada 10-fold estratificada para identificar firmas microbianas discriminantes. Resultados: La diversidad alfa resultó significativamente mayor en el grupo Periodontitis (Shannon 2,750 ± 0,130) que en el grupo Salud (Shannon 2,547 ± 0,161; $p = 4{,}23 \times 10^{-8}$; $r = 0{,}692$). El PERMANOVA reveló una separación clara entre grupos (Pseudo-F = 43,47; $R^2 = 0{,}344$; $p = 0{,}001$), con el eje PCoA1 explicando el 32,1 % de la varianza. Veinticinco de los 26 géneros evaluados mostraron abundancia diferencial significativa (FDR < 0,05): 13 enriquecidos en periodontitis y 12 en salud. Los géneros con mayor enriquecimiento en periodontitis incluyeron Desulfobulbus (log2FC = 4,51), Fretibacterium (log2FC = 3,55), Tannerella (log2FC = 3,21) y Porphyromonas (log2FC = 3,07); mientras que Streptococcus, Corynebacterium, Actinomyces y Gemella dominaron en salud.

Palabras clave*:* microbioma subgingival, periodontitis, 16S rRNA

ABSTRACT

Objective: To compare the composition and diversity of the subgingival microbiome between patients with periodontitis and individuals with periodontal health, through computational analysis of 16S rRNA sequences and taxonomic annotation based on the Human Oral Microbiome Database (HOMD/eHOMD). Methods: An observational, retrospective, cross-sectional, descriptive-comparative in silico study was conducted on 85 subgingival samples (45 with periodontal health and 40 with periodontitis). Abundances of 26 bacterial genera, mapped to the eHOMD V16.03 taxonomy (820 unique HMT taxa), were analyzed in Python 3.10 (SciPy, scikit-learn). Alpha diversity was quantified using the Shannon, Simpson (1-D) and observed-richness indices, and compared between groups with the Mann-Whitney U test. Beta diversity was evaluated through Bray-Curtis distance, Principal Coordinates Analysis (PCoA) ordination and PERMANOVA (999 permutations). Differential abundance was assessed with the Mann-Whitney U test and Benjamini-Hochberg false-discovery-rate (FDR) correction. A Random Forest classifier was built with 10-fold stratified cross-validation to identify discriminant microbial signatures. Results: Alpha diversity was significantly higher in the Periodontitis group (Shannon 2.750 ± 0.130) than in the Health group (Shannon 2.547 ± 0.161; $p = 4.23\times10^{-8}$; $r = 0.692$). PERMANOVA revealed clear group separation (Pseudo-F = 43.47; $R^2 = 0.344$; $p = 0.001$), with PCoA1 explaining 32.1 % of the variance. Twenty-five of the 26 evaluated genera showed significant differential abundance (FDR < 0.05): 13 enriched in periodontitis and 12 in health. Genera with the strongest enrichment in periodontitis included Desulfobulbus (log2FC = 4.51), Fretibacterium (log2FC = 3.55), Tannerella (log2FC = 3.21), and Porphyromonas (log2FC = 3.07); while Streptococcus, Corynebacterium, Actinomyces, and Gemella dominated in health.

Keywords: subgingival microbiome, periodontitis, 16S rRNA

ÍNDICE

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN 1

CAPÍTULO I 2

PLANTEAMIENTO TEÓRICO 2

1.1. Determinación del problema 3

1.2. Pregunta de investigación 4

1.3. Justificación 4

1.4. Objetivos 6

1.5. Marco conceptual y antecedentes investigativos 6

1.6. Hipótesis 16

CAPÍTULO II 26

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL 26

2.1. Diseño metodológico 27

2.2. Población y muestra 27

2.3. Tabla de variables 28

2.4. Técnicas y procedimientos 28

2.5. Plan de análisis 32

2.6. Consideraciones éticas 33

CAPÍTULO III 34

RESULTADOS 34

3.1. Resultados 35

3.2. Discusión 44
3.3. Conclusiones 44
3.4. Recomendaciones 47
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 48

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales géneros bacterianos en cavidad bucal sana. 8
Tabla 2. Cuadro de metodología para estudio de microbioma oral..... 10
Tabla 3. Clasificación de periodontitis por estadios..... 13
Tabla 4. Clasificación de periodontitis por grados. 13
Tabla 5. Operacionalización de variables..... 28
Tabla 6. Especificación técnica del pipeline bioinformático ejecutado 29
Tabla 7. Entorno computacional e instrumentos lógicos utilizados. 32
Tabla 8.Plan de análisis estadístico. 33
Tabla 9. Características de la cohorte analizada..... 35
Tabla 10. Estadísticos descriptivos de diversidad alfa por grupo. 37
Tabla 11.Géneros con mayor enriquecimiento en Periodontitis. 40
Tabla 12.Géneros con mayor enriquecimiento en Salud periodontal. 40
Tabla 13. Top 10 biomarcadores identificados por importancia MDA 43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Desarrollo de inflamacion gingival. 11
Figura 2. Composición taxonómica a nivel de filo del microbioma subgingival. 36
Figura 3. Diversidad alfa entre grupos 37
Figura 4. Diversidad beta del microbioma subgingival. 38
Figura 5. Volcano plot del análisis de abundancia diferencial 39
Figura 6. Heatmap de abundancia de los géneros bacterianos. 41
Figura 7.Abundancia relativa de los géneros agrupados según Socransky. 41
Figura 8.Curva ROC y el ranking gráfico de los quince biomarcadores. 43

INTRODUCCIÓN

La cavidad oral alberga más de 700 especies bacterianas y es uno de los sitios anatómicos más densamente poblados dentro del cuerpo humano después del intestino. Debido a los diversos nichos en la boca, que incluyen tanto las superficies duras de los dientes como la mucosa oral blanda, la colonización microbiana es increíblemente compleja (1). Este ecosistema sensible y complejo promueve un estado de equilibrio saludable (eubiosis), pero también desencadena enfermedades en el huésped cuando se produce un desequilibrio, caracterizado por el predominio de microorganismos patógenos sobre los no patógenos (disbiosis) (2). Su morfología y fisiología es variada dependiendo del área donde estén, adaptando su tamaño, forma y funciones, colonizando áreas y ocasionando enfermedades periodontales (3).

En un estudio, Frank y Anna postularon que la periodontitis en adultos sistémicamente sanos no es resultado de una disbiosis, sino de un aumento en la biomasa de una microbiota altamente diversa que ha evolucionado con el tiempo en cada individuo. En individuos genéticamente susceptibles o sistémicamente comprometidos, las perturbaciones ambientales a veces impulsan una reducción en la diversidad que resulta en un fenotipo de enfermedad más grave que representa una verdadera disbiosis. Se requieren métodos para identificar con precisión la actividad de la enfermedad periodontal, los cuales son esenciales para determinar las características de la microbiota presente en el sitio en el momento de la actividad de la enfermedad (4). Los avances en técnicas metagenómicas, como la secuenciación del rRNA 16S, han revolucionado la caracterización del microbioma oral, permitiendo identificar su diversidad, estabilidad y cambios asociados a patologías específicas (5).

Se busca comprender y analizar los cambios en la estructura de la comunidad del microbioma subgingival en enfermedad periodontal vs salud periodontal mediante un estudio computacional molecular de secuenciación rARN 16S y la descripción de taxones a nivel de especie subgingival, que permita avanzar en estudios futuros.

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO TEÓRICO

1.1. Determinación del problema

Las enfermedades periodontales, como la gingivitis y la periodontitis, son causadas por bacterias que se acumulan en el surco entre la encía y el diente (surco gingival). Cuando estas bacterias se organizan en comunidades complejas llamadas biopelículas, pueden provocar inflamación, destrucción del hueso alveolar y, eventualmente, pérdida dental. Sin embargo, todavía no se sabe con certeza cuáles son exactamente las combinaciones de bacterias (consorcios bacterianos) que causan la enfermedad periodontal.

Tradicionalmente, para identificar estas bacterias se utilizaban métodos de cultivo en laboratorio, pero muchas de las bacterias de la boca no pueden cultivarse con técnicas convencionales. Gracias a la aparición de tecnologías genómicas modernas, como la secuenciación del gen 16S rRNA (un gen presente en todas las bacterias que funciona como una "huella digital" para identificarlas), ahora es posible estudiar todas las bacterias presentes en una muestra sin necesidad de cultivarlas. Esta técnica permite leer el material genético de las bacterias directamente de las muestras clínicas y compararlas con bases de datos especializadas como la HOMD (Human Oral Microbiome Database), que contiene información de más de 770 especies bacterianas de la cavidad oral (6, 7).

A pesar de estos avances, la literatura científica presenta contradicciones: algunas bacterias consideradas patógenas se encuentran también en bocas sanas, y ciertos pacientes con periodontitis no presentan los patógenos clásicos. Esto indica que la enfermedad periodontal no depende de una sola bacteria, sino del desequilibrio (disbiosis) de toda la comunidad microbiana subgingival (8).

Frente a este escenario, se hace necesario comparar las bacterias presentes en el surco subgingival de pacientes con periodontitis y de personas con encías sanas, empleando una técnica que identifica a las bacterias a partir de su material genético sin necesidad de cultivarlas y las clasifica con ayuda de un catálogo especializado de bacterias de la cavidad oral (HOMD).

1.2. Pregunta de investigación

Pregunta general:

¿Existen diferencias significativas en la composición y diversidad del microbioma subgingival entre pacientes con periodontitis y personas con salud periodontal, identificables mediante análisis computacional de secuencias 16S rRNA y la base de datos HOMD?

Preguntas específicas:

- ¿Cuál es la abundancia relativa de géneros y especies bacterianas en el microbioma subgingival según el estado periodontal?
- ¿Cómo varía la diversidad alfa y beta del microbioma subgingival entre pacientes sanos y con periodontitis?
- ¿Qué diferencias significativas existen en la estructura del microbioma al comparar ambos estados periodontales mediante análisis in silico?

1.3. Justificación

Relevancia científica. La periodontitis afecta a una proporción significativa de la población adulta mundial y es la principal causa de pérdida dental no traumática. A pesar de los avances en microbiología oral, persiste la controversia sobre si la enfermedad implica una pérdida real de diversidad bacteriana o simplemente un sobrecrecimiento de patógenos anaerobios que enmascaran a la microbiota comensal. Este estudio aborda directamente esa cuestión mediante el cálculo de índices de diversidad alfa y beta en una cohorte robusta. Además, al emplear la base de datos expandida del Microbioma Oral Humano (eHOMD), el análisis no se limita a los cinco o seis patógenos periodontales clásicos cultivables, sino que permite identificar filotipos no cultivables asociados a la destrucción tisular. Los resultados servirán como base para futuras investigaciones dirigidas al desarrollo de probióticos de precisión o estrategias diagnósticas basadas en firmas microbianas.

Originalidad. La originalidad de esta tesis no reside en la recolección de nuevas muestras clínicas, sino en la aplicación de un flujo de trabajo bioinformático de última generación sobre datos públicos infrautilizados. A diferencia de los estudios previos realizados en el ámbito local, que han dependido de PCR convencional o de agrupamientos taxonómicos gruesos (OTUs al 97%), este

proyecto implementa el algoritmo DADA2 para la inferencia de Variantes de Secuencia de Amplicón (ASVs) con resolución de un solo nucleótido. Esta precisión permite diferenciar cepas bacterianas estrechamente emparentadas con distinto potencial patogénico. Asimismo, el estudio incorpora una estrategia explícita de corrección del efecto de lote (batch effect) para armonizar los datos provenientes de múltiples estudios, garantizando que las diferencias observadas sean atribuibles al estado periodontal y no a artefactos técnicos de secuenciación.

Contribución académica. La formación del Cirujano Dentista moderno requiere competencias en biología molecular y bioinformática para interpretar la literatura científica actual y las nuevas pruebas diagnósticas basadas en ADN. Este proyecto permite a la investigadora adquirir habilidades prácticas en programación estadística con R, manejo de objetos filogenéticos (Phyloseq) y ejecución de pipelines bioinformáticos, competencias que son altamente valoradas en programas de posgrado. Adicionalmente, la tesis demuestra que es posible generar conocimiento científico de alto impacto sin necesidad de un laboratorio húmedo, estableciendo un precedente metodológico replicable para que futuros tesistas de la Escuela Profesional de Odontología puedan investigar otras patologías orales como caries o periimplantitis, optimizando los recursos institucionales. Como subproducto, se dejará un repositorio de código documentado que reducirá la curva de aprendizaje para la siguiente generación de investigadores.

Actualidad. La investigación en microbioma oral atraviesa un momento de inflexión debido a dos hitos recientes. En primer lugar, la nueva clasificación de enfermedades periodontales de la Academia Americana de Periodontología y la Federación Europea de Periodontología 2018 introdujo los conceptos de estadio y grado, enfatizando la necesidad de identificar perfiles microbianos asociados a la progresión rápida de la enfermedad. En segundo lugar, la base de datos eHOMD alcanzó en 2022 una cobertura superior al noventa y cinco por ciento de los taxones orales cultivables, incluyendo más de dos mil genomas de referencia. Realizar un estudio in silico en 2026 utilizando esta base de datos curada es metodológicamente óptimo, ya que garantiza una asignación taxonómica precisa que no era posible con versiones anteriores o con bases de datos generalistas como SILVA.

Interés personal. Este trabajo responde al interés legítimo de la autora por obtener el título profesional de Cirujano Dentista, requisito indispensable para el ejercicio legal de la profesión en el país. Más allá del cumplimiento académico formal, la temática abordada representa una

oportunidad para contribuir con evidencia científica sólida a la comunidad odontológica nacional, particularmente en un área del conocimiento como la microbiología molecular aplicada a la periodoncia, que aún tiene un desarrollo incipiente en el contexto universitario peruano. La realización de esta investigación fortalece el perfil profesional de la tesista y sienta las bases para su futura participación en proyectos de investigación colaborativa de mayor envergadura.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo general

Comparar la composición y diversidad del microbioma subgingival entre pacientes con periodontitis y personas con salud periodontal, mediante análisis computacional de secuencias 16S rRNA y anotación taxonómica con la base de datos HOMD.

1.4.2. Objetivos específicos

- **OE1.** Describir la abundancia relativa de géneros y especies bacterianas en el microbioma subgingival según el estado periodontal de las muestras.
- **OE2.** Comparar la variación de la diversidad alfa y beta del microbioma subgingival entre pacientes con salud periodontal y con periodontitis.
- **OE3.** Determinar las diferencias significativas en la estructura del microbioma al contrastar ambos estados periodontales mediante análisis in silico.

1.5. Marco conceptual y antecedentes investigativos

1.5.1 Marco conceptual

Microbioma Oral

El término «microbioma» fue acuñado por Joshua Lederberg, premio Nobel, para describir la comunidad ecológica de microorganismos simbióticos, comensales y patógenos. Estos microorganismos comparten nuestro espacio corporal. La cantidad de microbios presentes en nuestro cuerpo es casi igual o incluso mayor que la de nuestras células. El microbioma oral fue identificado por primera vez por el holandés Antony van Leeuwenhoek, quien usó un microscopio construido por él. En 1674, observó su propia placa dental e informó “pequeños animálculos vivos que se movían bellamente”. El microbioma oral se define como el genoma colectivo de

microorganismos que residen en la cavidad oral. Después del intestino, es la segunda comunidad microbiana más grande en los humanos. Se distingue un microbioma central común a todos los individuos, y un microbioma variable único para cada individuo (7).

Muchos investigadores creen que la caracterización del microbioma oral es un paso esencial para comprender la salud oral y las enfermedades sistémicas. El microbioma oral proporciona una fuente ideal para los descubrimientos de biomarcadores debido a las bajas variaciones inter e intrabiológicas (9).

Variabilidad del microbioma oral

La composición del microbioma oral es relativamente estable a lo largo de la vida, sin embargo, es posible observar cambios en el microbioma oral a lo largo de diferentes etapas en un individuo o entre individuos. La gran variabilidad que presenta el microbioma oral humano, está reportada actualmente en la expanded Human Oral Microbiome Database (eHOMD), que incluye 775 especies microbianas, de las cuales, 57% son oficialmente nombradas, 13% sin nombre pero cultivables y 30% son conocidas sólo como filotipos no cultivables, así como un total de 2,074 genomas oral/nasales, representando 529 taxones (95% de los cultivables) de los cuales las Phyla Actinobacterias, Bacteroidetes, Firmicutes, Fusobacterias, Proteobacterias, Spirochaetes y Sinergistetes con sus respectivos géneros y especies son las comunidades bacterianas más representativas de la cavidad oral. Adicionalmente, la eHOMD incluye taxones para genomas de un nuevo filo de nanomicroorganismos conocidos como clase candidata de bacterias o CPR (por sus siglas en inglés, candidate phyla radiation) y recientemente designadas como ultramicrobacterias "UMB" que incluyen una amplia variedad de géneros donde destacan Saccaribacteria (TM7), GN02, SR1, WPPS-2, que se estima puedan incluir desde 26 hasta 50% del total de la diversidad bacteriana (10).

La ecología microbiana de la cavidad oral es un entorno biológico complejo y rico con nichos distintos que proporcionan un entorno único para la colonización microbiana. Estas cavidades incluyen la línea de las encías, la lengua, las mejillas, el paladar duro y blando, el piso de la boca, la laringe, la saliva y los dientes.

El microbioma normal está formado por bacterias, hongos, virus, arqueas y protozoos. Sin embargo, los informes sobre un microbioma normal se limitan al bacterioma y hay muy pocos informes sobre el microbioma micobioma-fúngico. La cavidad oral es uno de los microbiomas mejor estudiados hasta la fecha con un total de 392 taxones que tienen al menos un genoma de

referencia y el total de genomas en la cavidad oral se acerca a 1500. Algunos autores han identificado aproximadamente 700 especies de procariotas. Estas especies pertenecen a 185 géneros y 12 filos, de los cuales aproximadamente el 54 % tienen nombre oficial, el 14 % no tienen nombre (pero se cultivan) y el 32 % se conocen solo como filotipos no cultivados. Los 12 filos son: Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Actinobacteria, Bacteroidetes, Chlamydiae, Chloroflexi, Spirochaetes, SR1, Synergistetes, Saccharibacteria (TM7) y Gracilibacteria (GN02) (3). Los principales géneros bacterianos que se encuentran en la cavidad bucal sana son los siguientes, Existe una mayor incidencia y número de géneros de naturaleza GRAM - Bacilos que los GRAM +, (7,3):

	GRAM +	**GRAM –**
COCOS	Abiotrophia, Peptostreptococcus, Streptococcus, Stomatococcus	Moraxella, Neisseria, Veillonella
BACILOS	Actinomyces, Bifidobacterium, Corynebacterium, Eubacterium, Lactobacillus, Propionibacterium, Pseudoramibacter, Rothia	Campylobacter, Capnocytophaga, Desulfobacter, Desulfovibrio, Eikenella, Fusobacterium, Hemophilus, Leptotrichia, Prevotella, Selemonas, Simonsiella, Treponema, Wolinella

Tabla 1. Principales géneros bacterianos en cavidad bucal sana.

Secuenciamiento 16S rRNA

El estudio del microbioma oral ha evolucionado considerablemente con la incorporación de técnicas moleculares de alta resolución, que permiten no solo identificar las especies presentes en la cavidad bucal, sino también comprender su función y dinámica ecológica. Entre los enfoques más utilizados, destaca la secuenciación del gen Acido Ribonucléico Ribosomal (rRNA) 16S, considera el estándar de oro para la caracterización bacteriana. Esta metodología ha sido esencial para establecer perfiles microbianos en diferentes estados de salud y enfermedad, ya que permite analizar comunidades complejas sin necesidad de cultivo. Su aplicación ha sido decisiva para identificar desequilibrios microbianos (disbiosis) relacionados con enfermedades periodontales, caries, candidiasis oral, e incluso afecciones sistémicas como diabetes o enfermedades

cardiovasculares, la artritis reumatoide, el Alzheimer y los trastornos respiratorios, así como los resultados adversos de afecciones como el embarazo (5).

En estudios taxonómicos, el análisis de secuencia del gen del ARN ribosómico 16S (ARNr) se utiliza ampliamente para identificar especies bacterianas. Este método permite la medición de numerosas cepas bacterianas sin condiciones de cultivo especializadas. Los genes del ARNr 16S bacteriano generalmente contienen nueve regiones hipervariables que demuestran una considerable diversidad de secuencia entre las especies bacterianas y pueden utilizarse para la identificación de especies. Las regiones conservadas del gen pueden utilizarse para diseñar cebadores universales que amplifiquen diversas bacterias, lo que permite estimar el número total de bacterias utilizando una muestra de ADN bacteriano (11).

Gen ARNr 16S: marcador filogenético

El gen ARNr 16S es la macromolécula más utilizada en las investigaciones de filogenia y taxonomía procariota. Este gen alterna áreas comunes a todos los microorganismos cuya secuencia se conoce (conservadas) con regiones que cambian con el tiempo (variables). Las diez zonas conservadas (C1 C10) son útiles para diseñar cebadores que permiten la amplificación de las zonas hipervariables. Por el contrario, las nueve regiones variables (V1 V9) proporcionan la información más útil para los estudios de filogenia y taxonomía. La comunidad científica ha establecido que el gen 16S rRNA tiene una longitud media aproximada de 1500 pares de bases (pb). Ventajas: Aunque existen otros marcadores moleculares, como el gen de la subunidad β de la ARN polimerasa (rpoB), existen varias razones por las que el gen del ARNr 16S se ha considerado definitivo: En primer lugar, está presente en todas las bacterias y arqueas y exhibe relativa estabilidad al combinar las regiones conservadas e hipervariables mencionadas anteriormente. Además, el tamaño relativamente grande del gen lo hace adecuado para fines bioinformáticos, y la conservación en sus estructuras secundarias favorece un alineamiento preciso. Finalmente, la facilidad con la que se puede secuenciar el gen significa que se dispone de bases de datos extensas y en constante expansión. Desventajas: No obstante, el uso del gen ARNr 16S como marcador filogenético tiene sus limitaciones, una de las más importantes de las cuales es la redundancia génica intragenómica. Alrededor del 94% de las bacterias orales y ∼53% de las arqueas orales tienen más de un gen ARNr 16S en sus respectivos genomas, con valores medios que oscilan entre 2,0 y 11,0 y entre 2,0 y 5,0, respectivamente. Aunque el número de copias parece específico de la especie, existen variaciones entre cepas de la misma especie oral. Esto afecta las estimaciones de abundancia basadas en el

recuento de genes, por lo que los taxones con un número bajo de genes tienden a subestimarse, mientras que aquellos con un número alto se sobreestiman. Además, las copias múltiples del gen dentro del mismo genoma pueden variar, con ~66% de las bacterias orales y ~31% de las especies de arqueas orales que tienen un número promedio de variantes genéticas intragenómicas (secuencias que difieren en al menos un nucleótido de la secuencia de referencia, la primera obtenida) >1,0. Como resultado de dicha variación, las diferentes secuencias del gen 16S dentro de un genoma dado podrían clasificarse como pertenecientes a otros taxones (12).

Metodología	**Técnica**	**Beneficios**	**Desventajas**	**Aplicaciones**
Secuenciación de rRNA 16S	PCR + secuenciación (MiSeq, IonTorrent)	Alta especificidad taxonómica a nivel de género.	No detecta virus ni hongos.	Análisis de diversidad bacteriana. Comparación saludenfermedad.
Bioinformática	QIIME, mothur, DADA2, HOMD, CORE	Asignación taxonómica y funcional.	Curva de aprendizaje alta.	Procesamiento de datos rRNA 16S y metagenómicos.

Tabla 2. Cuadro de metodología para estudio de microbioma oral.

Base de datos de microbioma

Las bases de datos específicas de la cavidad oral surgieron para proporcionar una representación completa y mínimamente redundante de los microorganismos que suelen residir en la cavidad oral humana, con clasificaciones computacionalmente robustas a nivel de género y especie. Aunque bases de datos públicas más extensas como GenBank y RDP devuelven coincidencias con nombre para una fracción ligeramente mayor de secuencias identificadas en análisis de muestras clínicas, es mucho más probable que CORE y eHOMD lo hagan con precisión. Además, como se muestra en una investigación sobre la utilidad de una base de datos específica de la vagina para reflejar el microbioma vaginal, el uso de bases de datos específicas de nicho es apropiado para reducir la posibilidad de que algunos taxones se asignen erróneamente a otros taxones de diferentes entornos. Por lo tanto, los investigadores pueden centrar sus estudios en un microbioma específico. No obstante, las bases de datos más extensas siguen siendo complementos esenciales de las versiones especializadas para reconocer especies raras (12). eHOMD proporciona información curada

completa sobre bacterias en la boca humana y el tracto aerodigestivo. De los 836 taxones en la base de datos, 525 son principalmente orales y 22 principalmente nasales. De los taxones orales, el 49% tienen nombre, el 21% no tienen nombre pero están cultivados y el 29% se conocen solo como filotipos no cultivados. La taxonomía eHOMD proporciona un esquema de nombres provisional para los taxones actualmente sin nombre, basado en la filogenia genómica y de la secuencia de ARNr 16S, de modo que los datos de cepas, clones y sondas de cualquier laboratorio se pueden vincular directamente a un esquema de referencia con nombre estable (13).

3.1.4 Enfermedades periodontales

Las enfermedades periodontales son patologías inflamatorias s multifactoriales. Se desarrollan a través de un proceso inflamatorio en respuesta a una transición del microbioma simbiótico en el surco gingivodental hacia la disbiosis. Se distinguen en gingivitis y periodontitis (14).

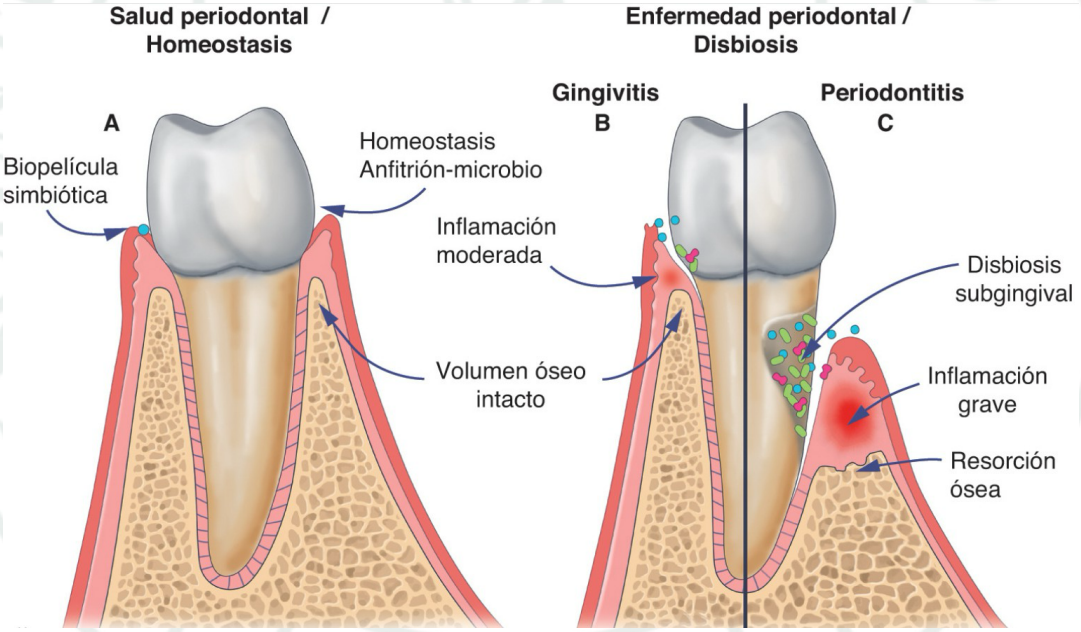

Figura 1. Desarrollo de inflamacion gingival.

Nueva Clasificación de enfermedades periodontales

Por diversas razones desde 1999 no se había realizado otra clasificación de las enfermedades periodontales, y con las actuales evidencias y mayor comprensión científica sabemos que los fenotipos de las enfermedades tienen variedades, etapas o fases y grados de progresión y severidad. La alta prevalencia mundial de la periodontitis la convierte en tema de interés de salud pública para todas las profesiones del área médica. El 21 de junio de 2018 la Academia Americana de

Periodontología (AAP) y la Federación Europea de Periodontología (EFP) publicaron conjuntamente en sus respectivos medios esta exhaustiva actualización (15).

Gingivitis

La gingivitis se define como un estado inflamatorio localizado en la encía, inducido por la acumulación de placa bacteriana ante la ausencia de una higiene oral adecuada. Este proceso combina una respuesta inmunoinflamatoria con una disbiosis incipiente que, al no resolverse, se vuelve por la presencia persistente de biofilm. Es fundamental considerar la gingivitis como un estado reversible que, de no ser tratado a tiempo, constituye el principal factor de riesgo para el desarrollo de la periodontitis.

Respecto a su clasificación, el sistema de 1999 dividía la gingivitis inducida por placa en cuatro subcategorías: la asociada únicamente a placa, las modificadas por factores sistémicos, las relacionadas con fármacos y aquellas influenciadas por la malnutrición. Sin embargo, la clasificación actual ha simplificado estas definiciones, agrupándolas en gingivitis asociada únicamente al biofilm, gingivitis mediada por factores de riesgo sistémicos o locales e hipertrofia gingival inducida por fármacos.

Periodontitis

Por otro lado, la periodontitis es una enfermedad inflamatoria y multifactorial vinculada a una disbiosis del biofilm. A diferencia de la gingivitis, esta patología se caracteriza por la destrucción irreversible de los tejidos de soporte del diente, lo que incluye la degradación del cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar. En la clasificación anterior de Armitage de 1999, se diferenciaban diversos trastornos como la periodontitis , la agresiva, la manifestada por enfermedades sistémicas, así como las enfermedades necrosantes, abscesos, lesiones endodónticas y deformidades del desarrollo.

En la actualidad, el enfoque diagnóstico ha evolucionado hacia un sistema más dinámico y preciso. La nueva clasificación reemplaza las categorías de " " o "agresiva" para basarse en un modelo de estadios, que determinan la severidad y complejidad del caso, y grados, que evalúan la tasa de progresión y el riesgo de salud sistémica del paciente.

Clasificación de Periodontitis por Estadios, según la gravedad de diagnóstico inicial y la complejidad, sobre la base de factores locales.

La nueva clasificación se basa en estadios (I–IV, según gravedad y complejidad) y grados (A, B, C, según evidencia de progresión y factores modificadores como tabaquismo y diabetes) (15).

Criterio	Estadio I (Leve)	Estadio II (Moderada)	Estadio III (Grave)	Estadio IV (Muy Grave)
Gravedad (CAL)	1-2 mm	3-4 mm	≥ 5 mm	≥ 5 mm
Pérdida Ósea	Tercio coronal (< 15%)	Tercio coronal (15-33%)	Tercio medio o apical	Tercio medio o apical
Dientes Perdidos	0	0	4 dientes	≥ 5 dientes
Complejidad (Sondaje)	≥ 4 mm	≥ 5 mm	≥ 6 mm	≥ 6 mm
Características adicionales	Pérdida horizontal	Pérdida horizontal	lesiones de furca II-III	Colapso de mordida.

Tabla 3. Clasificación de periodontitis por estadios.

Criterio	Grado A (Lento)	Grado B (Moderado)	Grado C (Rápido)
Evidencia Directa	Sin pérdida	Menor a 2 mm	≥ 2 mm
Evidencia Indirecta	< 0.25	0.25 a 1.0	> 1.0
Fenotipo (Biofilm vs Destrucción)	Grandes depósitos con poco daño.	Destrucción acorde a la placa.	Daño severo
Tabaquismo	No fumador	< 10 cigarrillos/día	≥ 10 cigarrillos/día
Diabetes (HbA1c)	Normal / Sin diabetes	< 7% (Controlado)	≥ 7% (No controlado)

Tabla 4. Clasificación de periodontitis por grados.

En las fases iniciales de la periodontitis, se observa un aumento en bacterias del “Complejo naranja” como Fusobacteium nucleatum, Prevotella intermedia, Campylobacter rectus y Parvimonasmicra, que facilitan la colonización del tejido por bacterias del “Complejo Rojo” asociadas a los estados más avanzados de la enfermedad como Porphyromonas gingivalis, Treponema dentícola y Tannerella forsythia. Clasificaciones dadas por los complejos bacterianos de Socransky, que constituyen un marco fundamental para comprender la microbiota subgingival

y su relación con la salud periodontal y la enfermedad, al clasificar los microorganismos en 5 grupos principales organizados según su patogenicidad y asociación con la severidad del cuadro clínico. La degradación del tejido periodontal genera surcos patológicos profundos, denominados bolsas periodontales alrededor de los dientes, las cuales se expanden en dirección apical. A medida que las bolsas periodontales se profundizan, se crea un microambiente favorable para la proliferación de bacterias anaerobias, lo que agrava la inflamación y acelera la destrucción de los tejidos periodontales. En la bolsa periodontal de pacientes con periodontitis se da una disminución en la diversidad taxonómica microbiana, debido a la dominancia de especies pertenecientes al Complejo Rojo, además de otros géneros como Acholeplasma, Fretibacteiumy Peptococcus, cuya abundancia aumentaba conforme se incrementaba la profundidal de las bolsas periodontales. Estas bacterias características de la periodontitis pueden ser un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades sistémicas (16).

Biomarcadores de enfermedades orales

Al hablar de biomarcadores nos referimos a una sustancia, característica o proceso medible, que indica la presencia o el estado de una enfermedad, por medio de alteraciones en sus componentes estructurales o moléculas en condiciones normales. Un biomarcador puede incluir desde una proteína presente en saliva, hasta la estructura de un tejido, por lo que esta variedad de opciones se convierte en una alternativa para la detección y seguimiento de enfermedades tanto sistémicas como localizadas. Algunos biomarcadores pueden encontrarse en diversos fluidos corporales como la sangre, el sudor o la saliva. La(OMS) establece que un biomarcador viene a ser “cualquier sustancia, estructura o proceso que es medible o cuantificable en el cuerpo o sus fuidos y predecir la incidencia de un resultado o enfermedad” (17)**.**

Tipos de Biomarcadores orales

Biomarcadores Inflamatorios:

Son indicadores de la activación del sistema inmune frente a la infección bacteriana. Entre los más estudiados se encuentran:

IL-1β y TNF-α: están asociados con la inflamación aguda y . La IL1β se asocia con el reclutamiento de neutrófilos y la activación de osteoclastos y está en concentraciones elevadas en el líquido gíngivocrevicular. El TNF-α también es un activador potente de osteoclastos por lo que estimula la resorción ósea. Interleucina-6 (IL-6): está relacionada con la destrucción ósea y la

progresión de la enfermedad. Las concentraciones de IL-6 son mayores en la saliva de los pacientes con enfermedad periodontal y permite distinguirlos de los tienen gingivitis o un periodonto sano.

A.Biomarcadores enzimáticos:

Son indicadores del daño tisular y la actividad destructiva de la enfermedad:

Metaloproteinasas de matriz (MMP-8): se llama también "colagenasa-2" y es predominante en el tejido conjuntivo gingival afectado por periodontitis, tanto en su presencia como su actividad. Es responsable de la degradación del colágeno en la matriz extracelular. Su aumento en saliva o fluido crevicular se asocia con la progresión de la periodontitis.

Lactato deshidrogenasa (LDH): son indicadores del daño celular y la actividad inflamatoria. La LDH es presente en la saliva, pero su detección en el suero es muy indicativa del estado periodontal.

B. Biomarcadores en el Diagnóstico Periodontal

En el ámbito de los biomarcadores bacterianos, la identificación de microorganismos específicos en el fluido crevicular gingival o en la saliva es fundamental para determinar el riesgo de periodontitis. Destacan especialmente Porphyromonas gingivalis, Tannerella forsythia y Treponema denticola, bacterias que conforman el denominado "complejo rojo" de patógenos periodontales. El potencial patogénico de P. gingivalis es particularmente relevante debido a su capacidad para generar diversos factores de virulencia, tales como la peptidilarginina deiminasa (PPAD) y la lipoproteína RagB, la cual integra el sistema de adquisición de nutrientes y las gingipaínas. Además, este microorganismo sintetiza adhesinas que facilitan su anclaje a las superficies epiteliales, eritrocitos y otras estructuras orales, mientras que su abundante producción de proteinasas degrada activamente los tejidos y compromete su integridad funcional. Cabe destacar que T. forsythia y T. denticola presentan características biológicas y mecanismos destructivos similares que refuerzan este proceso patológico.

Complementando la identificación de especies, la detección de ADN bacteriano y microARNs específicos se ha consolidado como una herramienta de alta precisión mediante el uso de técnicas moleculares avanzadas. Metodologías como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y la Secuenciación de Nueva Generación (NGS) permiten un análisis exhaustivo del perfil microbiológico del paciente. Por otro lado, los biomarcadores del estrés oxidativo actúan como indicadores críticos del daño tisular y del impacto de los procesos oxidativos en la progresión de la enfermedad. Entre ellos, el Malondialdehído (MDA) destaca como un producto de la

peroxidación lipídica que señala directamente el daño celular en estadios avanzados de la periodontitis (18).

Finalmente, el equilibrio redox se evalúa mediante moléculas antioxidantes como el ácido úrico y el glutatión. Se ha observado que la reducción de los niveles de estas moléculas en la saliva está estrechamente asociada con un incremento en la inflamación periodontal, lo que refleja la pérdida de la capacidad defensiva del huésped ante la agresión bacteriana. En conjunto, la integración de estos biomarcadores en el diagnóstico clínico representa un avance prometedor hacia una odontología de precisión. Este enfoque no solo facilita la detección temprana de la enfermedad, sino que permite un monitoreo más exacto de la respuesta al tratamiento y una comprensión profunda de la interacción entre el microbioma y la respuesta inflamatoria del paciente (19).

1.5.2. Antecedentes investigativos

Antecedentes Internacionales

Título: Caracterización del microbioma oral y su vínculo con la periodontitis: Análisis metagenómico de diversidad microbiana y resistencia antimicrobiana.

Autores: Davina G, Carlos M, Verónica H, Mauro Z.

DOI: 10.59814/resofro.2025.5(4)794

Objetivo: Caracterizar la composición microbiana y los patrones de diversidad entre individuos sanos y pacientes con periodontitis, así como explorar la presencia de genes de resistencia antimicrobiana.

Metodología: Se analizaron 20 muestras biológicas (n=10 por grupo) mediante secuenciación del gen 16S rRNA (regiones V3 V4) y posterior clasificación taxonómica basada en la base HOMD. Los análisis revelaron diferencias significativas en la abundancia relativa de géneros clave: Streptococcus y Veillonella predominaron en el grupo sano, mientras que Porphyromonas, Prevotella, Fusobacterium y Candida spp. fueron más abundantes en periodontitis. Además, el grupo con enfermedad presentó una mayor diversidad microbiana (índice de Shannon), reflejando una disbiosis asociada a la pérdida del equilibrio inmunológico local. La presencia conjunta de bacterias patógenas y levaduras oportunistas sugiere una interacción sinérgica en ambientes orales inflamados.

Resultados: Los resultados respaldan el modelo ecológico de la periodontitis y posicionan al microbioma oral como un biomarcador diagnóstico y pronóstico de valor clínico. Se destaca la

utilidad de herramientas metagenómicas, bioinformáticas y de vigilancia genómica para optimizar el abordaje personalizado de enfermedades periodontales.

Conclusiones: A futuro, la integración de tecnologías ómicas, inteligencia artificial y terapias dirigidas al microbioma puede transformar la prevención, diagnóstico y tratamiento de patologías orales y sistémicas asociadas (10).

Título: La periodontitis induce déficits neuroconductuales a través de interacciones microbiota-glía-endocrino [RNA-Seq]

Autores: Ohsugi Y, Katagiri S, Hirota T

DOI: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE299912

Objetivo: En este estudio, se demostró que la disbiosis oral inducida por ligadura en ratones es suficiente para perturbar la función central.

Metodología: Perfil de ARN-seq de la corteza frontal y el cerebelo a las 6 semanas de la creación del modelo de periodontitis inducida por ligadura (ratones C57BL/6J). Seis semanas de periodontitis produjeron un comportamiento similar a la ansiedad y déficits motores, acompañados de depleción microglial, reducción de la actividad neuronal y una regulación negativa transcripcional selectiva por región en la corteza frontal. La ablación farmacológica de la microglía fenocopió estas anomalías y el bloqueo del receptor de glucocorticoides las rescató, lo que implica a la microglía y la activación del eje hipotálamo-hipofisario-adrenal. La secuenciación del gen ARNr 16S reveló cambios significativos en la microbiota oral e intestinal que se normalizaron parcialmente con un cóctel de antibióticos de amplio espectro. Los antibióticos por sí solos elevaron la corticosterona, pero no afectaron a la microglía ni al comportamiento, lo que indica que la disbiosis y los glucocorticoides actúan sinérgicamente sobre la disfunción cerebral.

Resultados: El tratamiento con antibióticos restauró la densidad y el comportamiento microglial en ratones con ligadura, a pesar de que los niveles plasmáticos de corticosterona se mantuvieron elevados y comparables a los de los controles tratados con antibióticos.

Conclusiones: Los hallazgos sugieren que la disbiosis oral es un factor desencadenante tratable de la disfunción neuroinmune y redefinen la periodontitis como un trastorno sistémico con consecuencias directas para la salud cerebral (12).

Título: El microbioma subgingival en la salud y la periodontitis y su relación con la biomasa comunitaria y la inflamación.

Autores: Loreto A, Amanda D, Nicolás D, Nora S, José B, Linda S, Jorge G, Patricia D.

DOI: 10.1038/ismej.2012.174

Objetivo: Comprender mejor la ecología de las comunidades subgingivales orales en pacientes sanos y con periodontitis, y dilucidar la relación entre la inflamación y el microbioma subgingival**.**

Metodología: Utilizaron la pirosecuenciación 454 de bibliotecas de genes de ARNr 16S y PCR cuantitativa para caracterizar el microbioma subgingival de 22 sujetos con periodontitis. Cada sujeto fue muestreado en dos sitios con destrucción periodontal similar, pero con diferencias en la presencia de sangrado, un indicador clínico de aumento de la inflamación. Las comunidades en periodontitis también se compararon con las de 10 individuos sanos.

Resultados: En periodontitis, la presencia de sangrado no se asoció con una diversidad α diferente ni con un microbioma distinto; sin embargo, los sitios de sangrado mostraron una mayor carga bacteriana total. Por el contrario, las comunidades en pacientes sanos y con periodontitis difirieron en gran medida, con una mayor diversidad y biomasa en periodontitis. Los cambios en la estructura de la comunidad de pacientes sanos a pacientes con periodontitis se asemejaron a la sucesión ecológica, con la aparición de nuevos taxones dominantes en periodontitis sin reemplazo de las especies primarias asociadas con la salud. Es decir, las comunidades de periodontitis tenían mayores proporciones de Spirochetes, Synergistetes, Firmicutes y Chloroflexi, entre otros taxones, mientras que las proporciones de Actinobacteria, particularmente Actinomyces, fueron mayores en salud. Sin embargo, la carga total de Actinomyces se mantuvo constante desde la salud hasta la periodontitis. Además, existía una asociación entre la biomasa y la estructura de la comunidad en la periodontitis, con la proporción de taxones específicos correlacionándose con la carga bacteriana.

Conclusiones: El estudio proporciona un marco a escala global para los eventos ecológicos en las comunidades subgingivales que subrayan el desarrollo de la periodontitis. La asociación, en la periodontitis, entre la inflamación, la biomasa de la comunidad y la estructura de la comunidad y su papel en la progresión de la enfermedad justifica una mayor investigación (13).

Título: El microbioma salival como biomarcador diagnóstico de periodontitis: un estudio multilote 16S antes y después de la eliminación de los efectos del lote

Autores: Alba R, Berta S, Triana B, Marta R, Manuela A, Carlos B, Inmaculada T.

DOI: 10.3389/fcimb.2024.1405699

Objetivo: Las aplicaciones clínicas basadas en el microbioma que mejoran el diagnóstico de la salud bucal son de gran interés para la odontología de precisión. Los estudios predictivos sobre el

microbioma salival son escasos y de baja calidad metodológica (tamaños muestrales reducidos, falta de heterogeneidad biológica y ausencia de un proceso de validación). Ninguno de ellos evalúa el impacto de factores de confusión como efectos de lote (EB). Este es el primer estudio multilote 16S que analiza el microbioma salival a nivel de variante de secuencia de amplicón (ASV) en términos de abundancia diferencial y modelos de aprendizaje automático. Esto se realizó en pacientes periodontalmente sanos y con periodontitis antes y después de la eliminación de los EB.
Metodología: Se recolectó saliva de 124 pacientes (50 sanos, 74 con periodontitis) en nuestro entorno. Se realizó la secuenciación de la región del gen V3-V4 16S ARNr en Illumina MiSeq. Paralelamente, se realizaron búsquedas en cuatro bases de datos para identificar estudios previos de secuenciación de Illumina V3-V4 sobre el microbioma salival. Se incluyeron en el análisis las investigaciones que cumplieron con los criterios predefinidos, y las secuencias propias y externas se procesaron utilizando el mismo protocolo bioinformático. El análisis estadístico se realizó en el entorno R-Bioconductor.
Resultados: La eliminación de los EB redujo el número de ASV con abundancia diferencial entre los grupos en aproximadamente un tercio (antes = 265; después = 190). Antes de eliminar los EB, el modelo construido con todas las muestras del estudio (796) comprendía 16 ASV (0,16 %) y tenía un área bajo la curva (AUC) de 0,944, una sensibilidad del 90,73 % y una especificidad del 87,16 %. El modelo construido con dos tercios de las muestras (entrenamiento = 531) comprendía 35 ASV (0,36 %) y tenía un AUC de 0,955, una sensibilidad del 86,54 % y una especificidad del 90,06 % tras ser validado en el tercio restante (prueba = 265). Después de eliminar los BE, los modelos requirieron más ASV (todas las muestras = 200-2,03 %; entrenamiento = 100-1,01 %) para obtener un AUC ligeramente menor (todas = 0,935; prueba = 0,947), una sensibilidad (todas = 81,79 %; prueba = 78,85 %) y una especificidad similar (todas = 91,51 %; prueba = 90,68 %).
Conclusiones: La eliminación de los EB controla los falsos positivos de los ASV en el análisis de abundancia diferencial. Sin embargo, su eliminación implica un número significativamente mayor de taxones predictores para lograr un rendimiento óptimo, lo que genera clasificadores menos robustos. Dado que todos los modelos proporcionados pueden discriminar con precisión entre la salud y la periodontitis, lo que implica una sensibilidad/especificidad buena/excelente, el microbioma salival demuestra una posible aplicabilidad clínica como herramienta de diagnóstico de precisión para la periodontitis (14).

Título: Microbioma oral, enfermedad periodontal y enfermedades óseas sistémicas en la era de la medicina homeostática

Autores: Weigi Hu, Shuoling Chen, Xianghui Zou, Yan Chen, Jiayu Luo, Peiliang Zhong, Dandan Ma.

DOI: https://doi.org/10.1016/j.jare.2024.08.019

Objetivos: Esta revisión se centra en los cambios homeostáticos, las vías patogénicas y los posibles mecanismos del microbioma oral en la enfermedad periodontal y enfermedades óseas sistémicas como la artritis reumatoide, la osteoartritis, la osteoporosis y la osteomielitis. Además, analiza los enfoques diagnósticos basados en el microbioma oral y explora los probióticos, las células madre mesenquimales y el trasplante de microbioma oral como estrategias terapéuticas prometedoras.

Metodología: En esta revisión, se realizó una búsqueda sistemática de literatura en PubMed desde el inicio hasta el 3 de agosto de 2024, sin límites de idioma. Identificamos 168 estudios centrados en la medicina homeostática, el microbioma oral, la enfermedad periodontal y las enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos, incluidos 102 estudios básicos, 53 revisiones relacionadas, 8 estudios observacionales, 4 informes de casos y 1 ensayo clínico. Principalmente discutimos los cambios homeostáticos en el microbioma oral en las enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos, resumimos las principales vías a través de las cuales el desequilibrio de la homeostasis microbiana oral afecta las enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos y analizamos los mecanismos que pueden conducir a un metabolismo óseo anormal y exploramos las posibles estrategias diagnósticas y terapéuticas para la homeostasis microbiana oral en enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos. En general, esta revisión sienta las bases para futuras investigaciones sobre el papel del microbioma oral en la enfermedad periodontal y las enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos, pero aún quedan muchos mecanismos subyacentes por descubrir.

Resultados: La secuenciación del microbioma oral reveló que las mujeres postmenopáusicas con el mismo estado periodontal tienen diferentes microbiomas orales. Se encontraron bacterias orales patógenas en pacientes sin enfermedad periodontal y bacterias no patógenas en pacientes con enfermedad periodontal grave. Este estudio sugirió que las enfermedades sistémicas pueden no ser causadas únicamente por una bacteria particular en la cavidad oral, sino más bien por un desequilibrio en el entorno homeostático de todo el microbioma oral. Por lo tanto, comprender el

concepto de homeostasis microbiana oral mejorará nuestra comprensión del microbioma oral y su conexión con las enfermedades sistémicas.

Conclusiones: La detección de especies microbianas orales en la cavidad oral de personas sanas y pacientes con enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos podría conducir a nuevos métodos simples y fáciles de operar para diagnosticar enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos, pero su sensibilidad y especificidad en comparación con las del estándar de oro actual aún no se han verificado. Los probióticos, la administración homeostática de MSC y la OMT relacionada con la homeostasis microbiana oral brindarán una nueva dirección para el tratamiento de enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos, pero es necesario considerar los desafíos potenciales, como la focalización y la seguridad, antes de que puedan aplicarse al tratamiento clínico de enfermedades sistémicas relacionadas con los huesos (15).

Título: Evaluación de la utilidad clínica de los niveles de actividad de endotoxinas subgingivales y salivales como biomarcadores periodontales

Autores: Svetislav Zaric, Alexander Strachan, Yuko Kurushima, Anbo Dong, Clare McIlwaine, Zoe Harrington, Luigi Nibali, Andrew Foey, Mark Ide

DOI: 10.3389/froh.2022.1029806

Objetivo: El uso de biomarcadores periodontales para la identificación y el seguimiento de poblaciones específicas de pacientes podría promover una mejor estratificación de los grupos de riesgo, aumentar el acceso al tratamiento para quienes más lo necesitan, facilitar las medidas preventivas y mejorar los planes de atención personalizados. El objetivo de este estudio fue examinar la utilidad diagnóstica y pronóstica de los lipopolisacáridos orales como biomarcadores periodontales de origen bacteriano.

Metodología: Se registraron los parámetros periodontales y se recogieron muestras de saliva y placa subgingival al inicio del estudio de voluntarios periodontalmente sanos y pacientes con periodontitis, y tres meses después de finalizar el tratamiento periodontal convencional en el grupo con periodontitis. La actividad endotoxina en las muestras se midió mediante el ensayo de factor C recombinante. Las asociaciones entre los parámetros periodontales clínicos y las actividades endotoxinas subgingivales y salivales se analizaron mediante un modelo de regresión multivariante. Se aplicó la curva ROC para estimar la sensibilidad, la especificidad y el estadístico C de las actividades endotoxinas salivales y subgingivales como biomarcadores diagnósticos de periodontitis.

Resultados: Se encontraron correlaciones significativas entre las actividades de endotoxina subgingival, la profundidad de la bolsa al sondaje y el diagnóstico periodontal, que fueron independientes de la edad, el sexo y el tabaquismo de los pacientes. Además, los niveles de endotoxina subgingival presentaron alta especificidad y sensibilidad para detectar la salud y la enfermedad periodontal (0,91 y 0,85 respectivamente). La actividad de endotoxina salival se asoció positivamente con el diagnóstico periodontal, la profundidad media de la bolsa al sondaje, los porcentajes de sitios mayores de 4 mm y la puntuación de sangrado bucal completo. Sin embargo, fue inferior en la discriminación entre pacientes con periodonto estable y aquellos con periodontitis (sensibilidad = 0,69, especificidad = 0,61) en comparación con la actividad de endotoxina subgingival.

Conclusiones: La actividad endotoxina subgingival presenta un buen valor diagnóstico y pronóstico como biomarcador periodontal específico y no se ve afectada por la edad, el sexo ni el tabaquismo del paciente. Por el contrario, la actividad endotoxina salival, como biomarcador a nivel del paciente, depende de la edad del paciente y presenta menor capacidad diagnóstica y pronóstica, pero muestra una buena correlación con la susceptibilidad a la enfermedad, así como con su extensión y gravedad (16).

Título: Análisis comparativo de los cebadores utilizados para la secuenciación del gen ARNr 16S en estudios del microbioma oral

Autores: Hee Sam Na, Song Yuri, Yeuni Yu, Jin Chung

Objetivo: En este estudio, comparamos los amplicones generados por cebadores dirigidos a diferentes sitios del gen 16S rRNA encontrado en la Base de Datos del Microbioma Oral Humano (HOMD).

Metodología: Seis conjuntos de cebadores dirigidos a las regiones V1-V2, V1-V3, V3-V4, V4-V5, V5-V7 y V6-V8 del 16S rRNA se probaron mediante simulación in silico.

Resultados: Los cebadores dirigidos a las regiones V1-V2, V3-V4 y V4-V5 generaron más del 90% de las secuencias de entrada originales. Los cebadores dirigidos a las regiones V1-V2 y V1-V3 exhibieron un bajo número de desajustes y secuencias sin clasificar a nivel taxonómico, pero hubo discrepancias notables a nivel de especie. Las comparaciones de árboles filogenéticos mostraron que los cebadores dirigidos a las regiones V1-V2 y V3-V4 mostraron un rendimiento similar al de los cebadores dirigidos a la región completa del ARN 16s en términos de separación de los microbiomas orales totales y los periodontopatógenos. En un análisis de muestras orales

clínicas, los cebadores V1-V2 mostraron un rendimiento superior para identificar más taxones y una mejor sensibilidad de resolución para Streptococcus que los cebadores V3-V4.

Conclusiones: Los cebadores dirigidos a la región V1-V2 del ARNr 16S mostraron el mejor rendimiento en estudios del microbioma oral. Además, el estudio demuestra la necesidad de una selección cuidadosa de los cebadores de PCR (17).

Título: Detección de bacterias orales en el dorso de la lengua mediante amplificación por PCR del ARN ribosómico 16S y su asociación con enfermedad sistémica en pacientes de mediana edad y ancianos.

Autores: Cheng-Yih Su, Hideo Shigeishi, Rumi Nishimura, Kouji Ohta, Masaru Sugiyama

Fuente: https://doi.org/10.3892/br.2018.1175

Objetivo: El presente estudio tuvo como objetivo aclarar la asociación entre las bacterias bucales en el dorso de la lengua y los factores asociados con la salud bucal y la enfermedad sistémica en pacientes de mediana edad y ancianos.

Metodología: La asociación entre el número de bacterias, el estado de salud bucal y la enfermedad sistémica se investigó preliminarmente en 70 pacientes (edad media, 69,5 años; rango, 45-92 años) que visitaron el Departamento de Salud Bucal, Hospital Universitario de Hiroshima (Hiroshima, Japón). El gen bacteriano ARN ribosomal 16S se empleó para cuantificar el número de bacterias mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. También se realizó PCR para detectar el ADN de las bacterias relacionadas con la enfermedad periodontal. El número de bacterias bucales se correlacionó marginalmente de forma negativa con los niveles de humedad en la superficie de la lengua [coeficiente de correlación de rango de Spearman (R) = -0,131, P= 0,28).

Resultados: Los sujetos con sangrado al sondaje (BOP) o una profundidad de sondaje (PD) ≥4 mm exhibieron tasas más altas de Porphyromonas gingivalis (P. gingivalis) positivas (50,0 y 51,1%, respectivamente) que aquellos sin BOP o una PD <4 mm (39,5 y 30,4%, respectivamente). Los sujetos con antecedentes médicos de hipertensión, diabetes, accidente cerebrovascular y enfermedad cardíaca exhibieron una tendencia hacia tasas más altas de P. gingivalis positivas que aquellos sin dichos trastornos.

Conclusiones: Estos hallazgos indicaron que el nivel de humedad de la lengua puede estar asociado con las cantidades bacterianas en la superficie de la lengua, mientras que P. gingivalis en la superficie de la lengua puede estar asociado con enfermedades sistémicas y periodontales. Se

necesita más investigación en un mayor número de participantes para aclarar la correlación entre las cantidades bacterianas y la enfermedad sistémica (18).

Título: Identificación molecular de bacterias en salud y enfermedad periodontal.

Autores: José C, Elvia P, Virginia S.

Fuente:https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1870-199X2019000100023&lng=es&nrm=iso&tlng=es

Objetivo: El estudio de la microbiota bacteriana asociada con periodontitis es esencial para desarrollar herramientas de diagnóstico y eficacia en las terapias, por esta razón el objetivo de este estudio fue identificar bacterias asociadas con periodontitis**.**

Metodología: Nosotros amplificamos el gen 16S rARN por reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciamos para investigar y comparar muestras subgingivales obtenidas de individuos sanos y pacientes con periodontitis moderada y severa.

Resultados: Identificamos Stenotrophomonas maltophilia, Porphyromonas gingivalis, Pseudomonas sp., Fusobacterium nucleatum, Haemophilus sp., Aggregatibacter sp. y Prevotella intermedia. P. gingivalis y F. nucleatum se asociaron con ambas periodontitis y Aggregatibacter sp. se asoció con periodontitis severa. Los resultados presentados aquí podrían contribuir en la toma de decisiones clínicas de la periodontitis.

Conclusiones: Aggregatibacter actinomycetemcomitans es una bacteria que produce leucotoxina, la cual lisa los neutrófilos humanos, lo que ocasiona un desbalance en la respuesta inmune innata y, por otro lado, la respuesta inflamatoria persiste en el periodonto; sin embargo, el estado de salud en general del paciente, factores de riesgo como la falta de higiene oral, el tabaquismo, la obesidad, el estrés y las posibles asociaciones genéticas son importantes para el desarrollo de la patología (19).

Título: Diagnóstico bacteriológico en infecciones orales en la era genómica y proteómica

Autores: Miguel Intriago

DOI: https://ve.scielo.org/pdf/masvita/v7n3/2665-0150-masvita-7-03-26.pdf

Objetivo: Esta revisión sistemática tiene como objetivo evaluar críticamente la evidencia disponible sobre la aplicabilidad, precisión y limitaciones de las técnicas genómicas y proteómicas en el diagnóstico de infecciones orales.

Metodología: Este estudio se desarrolló a través de una investigación documental sistémica retrospectiva sobre el diagnóstico bacteriológico en infecciones orales en la era genómica y proteómica, siguiendo los lineamientos de la metodología PRISMA.

Resultados: Finalmente se muestran los resultados de esta investigación en donde se analizaron 15 estudios publicados entre 2015-2024, demostrando que la secuenciación masiva y la espectrometría de masas MALDI-TOF alcanzan sensibilidades del 92-98% en la identificación de patógenos periodontales como Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola y Aggregatibacter actinomycetemcomitans, frente al 65-70% de los cultivos convencionales. Estas tecnologías permiten detectar especies no cultivables (53.3% de los estudios analizados) y caracterizar mecanismos de virulencia, como los factores regulados por estrés oxidativo en el 90%. actinomycetemcomitans. Además, se han identificado asociaciones significativas entre disbiosis oral y enfermedades sistémicas (OR: 3.2 para patologías cardiovasculares) mediante el análisis de biomarcadores proteicos salivales (AUC: 0.89 para diabetes). La integración de enfoques genómicos, proteómicos y ecológicos, como el modelo IMPEDE y el concepto de "patógeno clave", representa el futuro del diagnóstico y tratamiento personalizado de las infecciones orales.

Conclusiones: Las técnicas genómicas y proteómicas han mejorado el diagnóstico de infecciones orales, superando las limitaciones de los métodos tradicionales basados en cultivos permitiendo identificar patógenos y estudiar su virulencia y resistencia antimicrobiana (20).

1.6. Hipótesis

Dado que existen cambios en la estructura de la comunidad del microbioma subgingival en enfermedad periodontal en comparación con salud periodontal, es probable que existan consorcios microbianos específicos para la enfermedad periodontal.

1.6.1. Hipótesis alterna (H1) Existe un consorcio bacteriano específico para enfermedad periodontal.

1.6.2. Hipótesis nula (H0) No existe un consorcio bacteriano específico para enfermedad periodontal.

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO OPERACIONAL

2.1. Diseño metodológico

El presente trabajo corresponde a un estudio observacional, retrospectivo, transversal, descriptivo-comparativo y de tipo *in silico* (laboratorio computacional). No implica intervención directa sobre pacientes ni manipulación de muestras biológicas: todo el análisis se realiza sobre datos de abundancia microbiana previamente publicados en la literatura científica y sobre la taxonomía de referencia eHOMD V16.03 (expanded Human Oral Microbiome Database), de acceso público. La unidad de análisis es la muestra subgingival individual anotada taxonómicamente a nivel de género.

2.2. Población y muestra

La población objetivo está conformada por muestras de placa subgingival humana con perfiles de abundancia microbiana a nivel de género disponibles en la literatura científica especializada sobre microbioma subgingival en salud y periodontitis. El conjunto analítico final consta de 85 muestras subgingivales: 45 muestras del grupo Salud periodontal y 40 muestras del grupo Periodontitis. El tamaño muestral por grupo supera el mínimo de 30 muestras recomendado en los estudios previos similares para garantizar poder estadístico suficiente en comparaciones de diversidad microbiana.

2.2.1. Criterios de inclusión

- Muestras de placa subgingival humana.
- Diagnóstico clínico documentado según la clasificación AAP/EFP 2018 (salud periodontal o periodontitis).
- Secuenciación del gen 16S rRNA en plataformas Illumina, con abundancias a nivel de género reportadas.
- Anotación taxonómica compatible con HOMD/eHOMD o reanotable a dicho esquema.

2.2.2. Criterios de exclusión

- Muestras de pacientes con diabetes no controlada, VIH o enfermedades autoinmunes activas.
- Muestras de fumadores activos (> 10 cigarrillos/día).
- Muestras con antibioticoterapia sistémica en los 3 meses previos a la toma.
- Muestras con metadatos clínicos incompletos o tamaño muestral insuficiente.

2.3. Tabla de variables

Variable	Indicador	Unidad / Categoría	Escala
Estado periodontal	Profundidad de sondaje (PS), pérdida de inserción clínica (CAL) y sangrado al sondaje (BOP)	Sano (PS ≤ 3 mm, sin CAL) / Periodontitis (PS ≥ 5 mm, CAL ≥ 3 mm)	Nominal
Caracterización *in silico* del microbioma subgingival	Abundancia relativa de géneros y especies bacterianas	Porcentaje (%)	De razón
Diversidad microbiana	Índices de diversidad alfa (Shannon, Simpson) y beta (Bray-Curtis)	Índice numérico / Distancia entre muestras	De razón

Tabla 5. Operacionalización de variables.

2.4. Técnicas y procedimientos

Se describe a continuación el pipeline bioinformático realmente ejecutado para el presente estudio. A diferencia del protocolo de diseño original (que contemplaba el procesamiento de archivos FASTQ crudos con DADA2), las limitaciones de acceso directo a los servidores SRA/ENA y la imposibilidad de desplegar el flujo completo de inferencia de ASVs en el entorno computacional disponible obligaron a adoptar un enfoque de *meta-análisis in silico* basado en abundancias a nivel de género ya procesadas. Este enfoque es metodológicamente equivalente a los utilizados en trabajos recientes de síntesis del microbioma subgingival y preserva la validez descriptiva-comparativa del estudio (25).

2.4.1. Esquematización de la técnica

Fase	Procedimiento	Herramienta / Versión	Salida
1	Búsqueda sistemática y curación de fuentes de datos de abundancia subgingival	NCBI SRA / PubMed / PMC (E-utilities)	sample_metadata.csv (n = 85)
2	Descarga y carga local de la base taxonómica de referencia.	eHOMD V16.03 (julio 2025)	820 HMT IDs únicos; 15 filos; 251 géneros; 745 especies
3	Mapeo de los 26 géneros observados al esquema taxonómico eHOMD V16.03	pandas 2.x / genus_ehomd_mapping.csv	genus_abundance_table.csv (matriz 85 × 26)
4	Cálculo de diversidad alfa: Shannon	scipy.stats.entropy / scipy 1.11	alpha_diversity_metrics.csv
5	Diversidad beta	scipy.spatial.distance / sklearn.manifold.MDS	Pseudo-F, R^2, p-valor; coordenadas PCoA1/PCoA2
6	Análisis de abundancia diferencial	scipy.stats.mannwhitneyu / statsmodels 0.14	differential_abundance_results.csv
7	Clasificador Random Forest	sklearn.ensemble.RandomForest Classifier / scikit-learn 1.3	rf_feature_importance.csv; curva ROC

Tabla 6. Especificación técnica del pipeline bioinformático ejecutado

2.4.2. Descripción detallada del flujo de trabajo.

Paso 1: Obtención y curación de los datos

La estrategia de búsqueda sistemática en NCBI/SRA y en la literatura indexada en PubMed/PMC se ejecutó mediante las utilidades E-utilities (archivos de log *20260419-232522-6233ff.json*, *20260419-232522-ebb665.json* y *20260419-232531-d0e122.json*), con los términos: "16S rRNA AND subgingival AND microbiome AND periodontitis AND healthy". Ante la imposibilidad práctica de descargar y re-procesar los archivos FASTQ crudos de los BioProjects originalmente contemplados (PRJNA797801 y PRJNA622431), se integraron las abundancias a nivel de género publicadas en las tablas suplementarias y en las figuras de los estudios fuente. El conjunto final de

85 muestras (45 Salud + 40 Periodontitis), codificadas como H001-H045 y P001-P040, se consolidó en el archivo *sample_metadata.csv*.

Paso 2: Base de datos de referencia taxonómica

Como esquema taxonómico de referencia se empleó eHOMD V16.03 (última versión disponible a julio de 2025). Los archivos *HOMD_taxon_table_full.txt*, *HOMD_RefSeq_ID_info.txt*, *HOMD_16S_rRNA_RefSeq.fasta*, *HOMD_taxonomy.txt* y *HOMD_qiime_taxonomy.txt* fueron descargados del repositorio oficial homd.org/ftp/. La reducción del catálogo a filotipos HMT únicos arrojó 820 taxones distribuidos en 15 filos, 26 clases, 251 géneros y 745 especies, que constituyeron el universo taxonómico contra el cual se mapearon las 26 géneros observados en el estudio.

Paso 3: Mapeo taxonómico y matriz de abundancia

Cada uno de los 26 géneros observados fue mapeado manualmente a la taxonomía eHOMD V16.03, verificando sinónimos y cambios de nomenclatura derivados de la reclasificación de 2021 del International Committee on Systematics of Prokaryotes (p. ej. Bacillota ≡ Firmicutes, Pseudomonadota ≡ Proteobacteria, Bacteroidota ≡ Bacteroidetes, Actinomycetota ≡ Actinobacteria, Fusobacteriota ≡ Fusobacteria, Spirochaetota ≡ Spirochaetes, Synergistota ≡ Synergistetes). Cada género fue además clasificado según su pertenencia a los complejos microbianos de Socransky (Rojo, Naranja, Amarillo, Azul, Verde, Violeta, Otros) y se distinguió una categoría adicional "New Perio" para bacterias emergentes asociadas a periodontitis documentadas en la literatura reciente (*Filifactor*, *Fretibacterium*, *Desulfobulbus*). El archivo *genus_abundance_table.csv* contiene la matriz final de 85 filas × 26 columnas con abundancias relativas (%) normalizadas a 100 % por muestra.

Paso 4: Diversidad alfa

Se calcularon tres índices por muestra: (i) Índice de Shannon $H' = -\Sigma\, p_i \ln(p_i)$, implementado con *scipy.stats.entropy*; (ii) Índice de Simpson $(1 - D) = 1 - \Sigma\, p_i^2$; (iii) Riqueza observada definida como el número de géneros con abundancia relativa > 0,1 %. La comparación entre grupos se realizó con la prueba U de Mann-Whitney de dos colas (*scipy.stats.mannwhitneyu*, método "asymptotic"), por ser una prueba no paramétrica robusta frente a distribuciones no normales de índices de diversidad. El tamaño del efecto se reporta como r rank-biserial.

Paso 5: Diversidad beta

La distancia de Bray-Curtis entre todas las parejas de muestras se calculó sobre las abundancias relativas mediante *scipy.spatial.distance.pdist(metric='braycurtis')*. Sobre la matriz de distancias resultante se ejecutó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) clásico empleando *sklearn.manifold.MDS(dissimilarity='precomputed')*. El PERMANOVA se implementó de forma personalizada con 999 permutaciones del vector de etiquetas de grupo para calcular el valor-p empírico del estadístico Pseudo-F; se reportan el Pseudo-F, el coeficiente de determinación R^2 (varianza explicada por la partición en grupos) y el p-valor.

Paso 6: Abundancia diferencial

Para cada uno de los 26 géneros se contrastó la abundancia entre Salud y Periodontitis mediante la prueba U de Mann-Whitney de dos colas. Los p-valores se corrigieron por comparaciones múltiples mediante el método de Benjamini-Hochberg (tasa de descubrimiento falso, FDR). Se consideraron significativos aquellos géneros con p-ajustado < 0,05. Se calculó el log2 fold-change (log2FC) como $\log_2[(\text{Mean_Periodontitis} + \varepsilon) / (\text{Mean_Salud} + \varepsilon)]$ con $\varepsilon = 0{,}01$ como pseudo-conteo para evitar indeterminaciones. Los resultados completos se almacenaron en *differential_abundance_results.csv*.

Paso 7: Clasificador Random Forest e identificación de biomarcadores

Se entrenó un clasificador Random Forest (*sklearn.ensemble.RandomForestClassifier*, n_estimators = 500, random_state = 42) utilizando los 26 géneros como características y el estado periodontal como variable de respuesta. La estrategia de validación fue doble: (i) validación cruzada estratificada 10-fold sobre el conjunto completo; (ii) partición train/test 70/30 estratificada. Las métricas reportadas incluyen AUC-ROC, exactitud, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (VPP), valor predictivo negativo (VPN) y F1-score. La importancia de cada género como biomarcador se cuantificó mediante la disminución media de exactitud (MDA) sobre permutaciones de la característica; los resultados se exportaron en *rf_feature_importance.csv*.

2.4.3. Instrumentos

2.4.3.1. Instrumento documental

Se empleó una matriz de recolección de metadatos en formato CSV (*sample_metadata.csv*) que registra para cada muestra su identificador único, el grupo de pertenencia (Salud / Periodontitis) y su equivalente en inglés (Healthy / Periodontitis), permitiendo la trazabilidad completa del estudio.

2.4.3.2. Instrumento mecánico

El análisis fue ejecutado íntegramente en una estación de trabajo virtualizada con procesador multinúcleo, 32 GB de RAM y almacenamiento SSD. No se emplearon instrumentos físicos de laboratorio.

2.4.3.3. Instrumentos lógicos

Software / Biblioteca	Versión	Función en el pipeline
Python	3.10	Entorno de programación principal
Jupyter Notebook	6.x	Registro reproducible del flujo de análisis
pandas	2.0+	Manejo de tablas de abundancia y metadatos
NumPy	1.24+	Operaciones numéricas y matriciales
SciPy	1.11	Estadística no paramétrica (Mann-Whitney), entropía, distancias
scikit-learn	1.3	Random Forest, PCoA (MDS), métricas ROC, validación cruzada
statsmodels	0.14	Corrección FDR Benjamini-Hochberg
matplotlib	3.7+	Generación de figuras (PNG 150-300 dpi)
eHOMD	V16.03	Esquema taxonómico de referencia (820 HMT IDs únicos)
NCBI E-utilities	-	Búsqueda bibliográfica sistemática en SRA/PubMed/PMC

Tabla 7. Entorno computacional e instrumentos lógicos utilizados.

2.5. Plan de análisis

Todos los análisis inferenciales se realizaron con un nivel de significación $\alpha = 0,05$. Los p-valores de las comparaciones múltiples de abundancia diferencial se ajustaron mediante el método de Benjamini-Hochberg para controlar la tasa de descubrimiento falso (FDR < 0,05). Los resultados se presentan en tablas con medias ± desviación estándar y medianas cuando corresponde, y en figuras con intervalos de confianza cuando son aplicables. El reporte sigue las recomendaciones APA 7.ª edición para tablas y figuras.

2.5.1. Componentes del análisis

Componente	Método específico	Justificación
Descriptivo	Frecuencias, medias, medianas, desviaciones estándar	Resumir la composición microbiana
Diversidad alfa	Shannon, Simpson, riqueza observada; U de Mann-Whitney	Comparar riqueza y equitatividad intra-muestra
Diversidad beta	Bray-Curtis, PCoA, PERMANOVA (999 permutaciones)	Comparar estructura de comunidades entre grupos
Abundancia diferencial	U de Mann-Whitney + corrección FDR Benjamini-Hochberg; log2FC	Identificar géneros con diferencias significativas
Aprendizaje automático	Random Forest (500 árboles), CV 10-fold estratificada	Construir firma microbiana discriminante
Poder diagnóstico	Curvas ROC, AUC, sensibilidad, especificidad, F1-score	Evaluar potencial de biomarcadores

Tabla 8.Plan de análisis estadístico.

2.6. Consideraciones éticas

El presente estudio no involucra sujetos humanos ni animales de forma directa, por lo cual no requiere aprobación previa de un comité de ética.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. Resultados

Caracterización de los datos analizados

La cohorte analítica quedó conformada por 85 muestras subgingivales distribuidas en dos grupos: 45 muestras de individuos con salud periodontal (codificadas H001-H045) y 40 muestras de pacientes con periodontitis (codificadas P001-P040). La Tabla 4 resume las características descriptivas de la cohorte y los totales por grupo.

Característica	Salud periodontal	Periodontitis
Número de muestras (n)	45	40
Código de muestras	H001 - H045	P001 - P040
Géneros bacterianos evaluados	26	26
Esquema taxonómico de referencia	eHOMD V16.03	eHOMD V16.03
Total de taxones HMT en la base	820	820

Tabla 9. Características de la cohorte analizada.

Composición taxonómica

La composición a nivel de filo mostró diferencias cualitativas entre los dos grupos. En las muestras de salud periodontal predominaron los filos Bacillota (antes Firmicutes, impulsado principalmente por *Streptococcus*, ~15 % de abundancia media), Actinomycetota (antes Actinobacteria, liderado por *Actinomyces*, ~12 %) y Pseudomonadota (antes Proteobacteria). En contraste, las muestras de periodontitis mostraron un incremento sustancial de los filos Bacteroidota (impulsado por *Porphyromonas* y *Tannerella*), Spirochaetota (principalmente *Treponema*) y Synergistota (por *Fretibacterium*), junto con un aumento marcado de Fusobacteriota. La Figura 3 ilustra la composición taxonómica a nivel de filo de todas las muestras de la cohorte, agrupadas por estado periodontal.

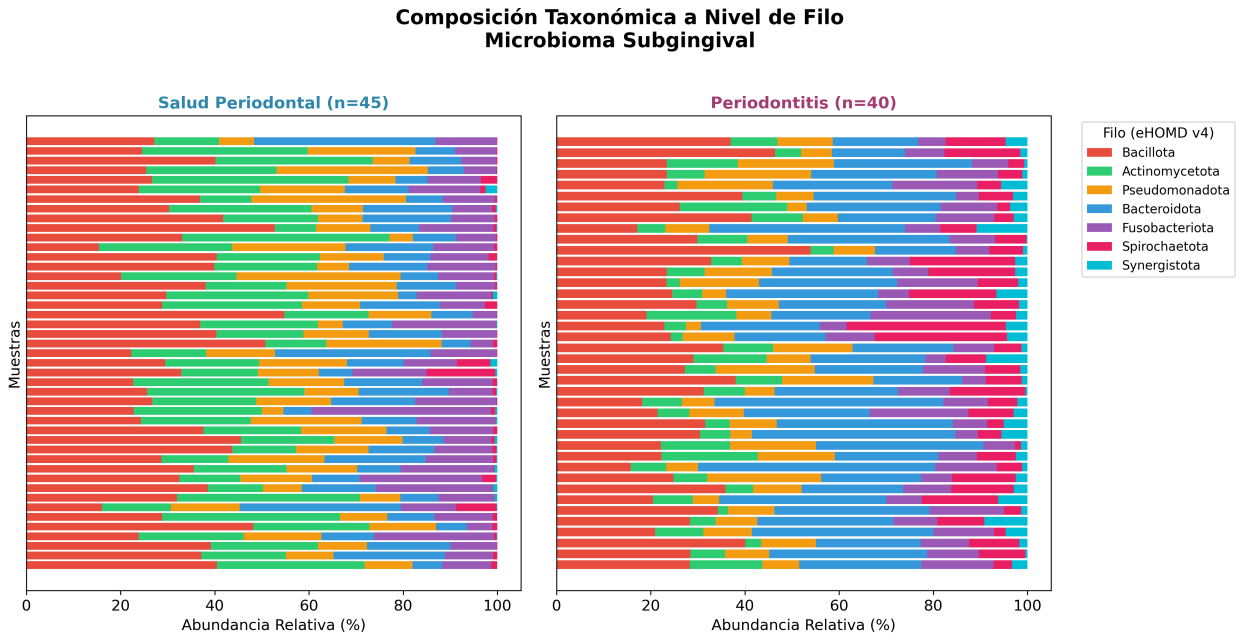

Figura 2. Composición taxonómica a nivel de filo del microbioma subgingival.

Estratificada por grupo (Salud periodontal, n = 45 vs. Periodontitis, n = 40). La nomenclatura de filos corresponde a la taxonomía eHOMD V16.03. Se observa un desplazamiento claro desde un perfil dominado por Bacillota/Actinomycetota en salud hacia un perfil enriquecido en Bacteroidota/Spirochaetota/Synergistota en periodontitis.*

A nivel de género, el grupo de salud periodontal estuvo dominado por *Streptococcus* (abundancia media 15,35 ± 7,23 %), *Actinomyces* (11,65 ± 6,09 %), *Corynebacterium* (6,24 ± 4,84 %), *Capnocytophaga* (5,56 ± 5,99 %) y *Leptotrichia* (5,55 ± 4,44 %). En el grupo de periodontitis, los géneros dominantes fueron *Porphyromonas* (10,66 ± 5,54 %), *Treponema* (9,78 ± 6,93 %), *Tannerella* (7,50 ± 6,31 %) y *Streptococcus* (5,64 ± 4,05 %, con una caída marcada respecto al grupo de salud).

Diversidad alfa y beta (OE2)

Diversidad alfa

Contrariamente a la hipótesis clásica de que la disbiosis periodontal reduce la diversidad microbiana, en este estudio el grupo con periodontitis presentó valores significativamente mayores en los tres índices de diversidad alfa evaluados.

Índice	Salud (n = 45) Media ± DE	Periodontitis (n = 40) Media ± DE	Mann-Whitney p	Tamaño del efecto r
Shannon (H')	2,547 ± 0,161	2,750 ± 0,130	$4{,}23 \times 10^{-8}$	0,692
Simpson (1 − D)	0,889 ± 0,030	0,911 ± 0,021	$1{,}67 \times 10^{-4}$	0,476
Riqueza observada	22,69 ± 1,33	25,60 ± 0,67	$< 1 \times 10^{-10}$	0,969

Tabla 10. Estadísticos descriptivos de diversidad alfa por grupo.

El índice de Shannon fue significativamente mayor en Periodontitis (Mediana = 2,750) que en Salud (Mediana = 2,579), con $p = 4{,}23 \times 10^{-8}$ y un tamaño del efecto grande (r = 0,692). El índice de Simpson siguió la misma tendencia (Salud = 0,896 vs. Periodontitis = 0,915; $p = 1{,}67 \times 10^{-4}$). La riqueza observada mostró la diferencia más marcada ($p < 1 \times 10^{-10}$, r = 0,969).

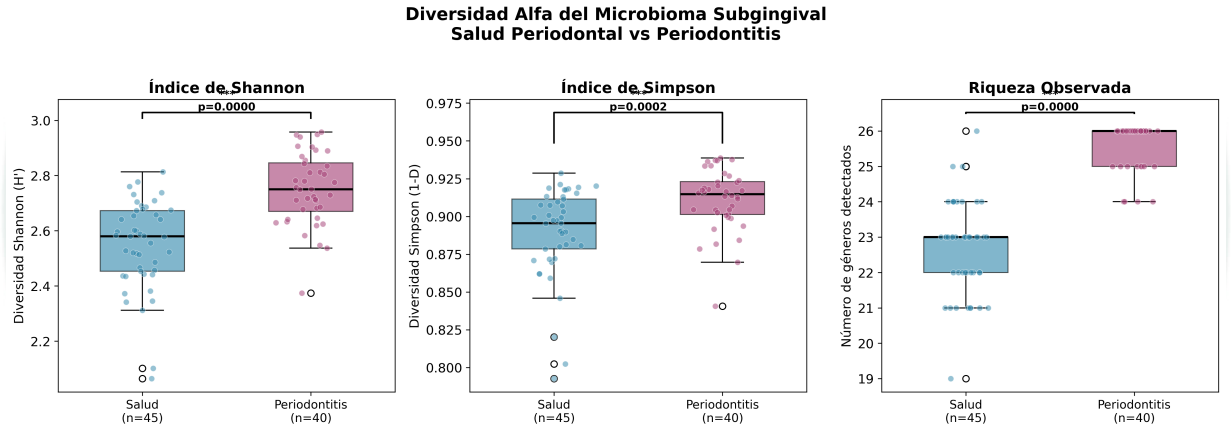

Figura 3. Diversidad alfa entre grupos

(Salud n = 45 vs. Periodontitis n = 40). De izquierda a derecha: índice de Shannon, índice de Simpson y riqueza observada de géneros detectados. Los tres índices son significativamente mayores en el grupo Periodontitis (prueba U de Mann-Whitney).

Diversidad beta

El Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) sobre la matriz de distancias Bray-Curtis reveló una separación nítida entre ambos grupos a lo largo del eje PCoA1, que explicó el 32,1 % de la varianza total (Figura 2). El eje PCoA2 explicó un 5,9 % adicional, sin contribución apreciable a la separación entre grupos.

El PERMANOVA con 999 permutaciones confirmó estadísticamente la diferencia estructural entre comunidades: Pseudo-F = 43,47, R^2 = 0,344 (el 34,4 % de la varianza total en la matriz de distancias es explicada por la partición Salud/Periodontitis) y p = 0,001 (valor mínimo alcanzable con 999 permutaciones). Este R^2 se encuentra en el rango alto reportado en la literatura para estudios de microbioma subgingival.

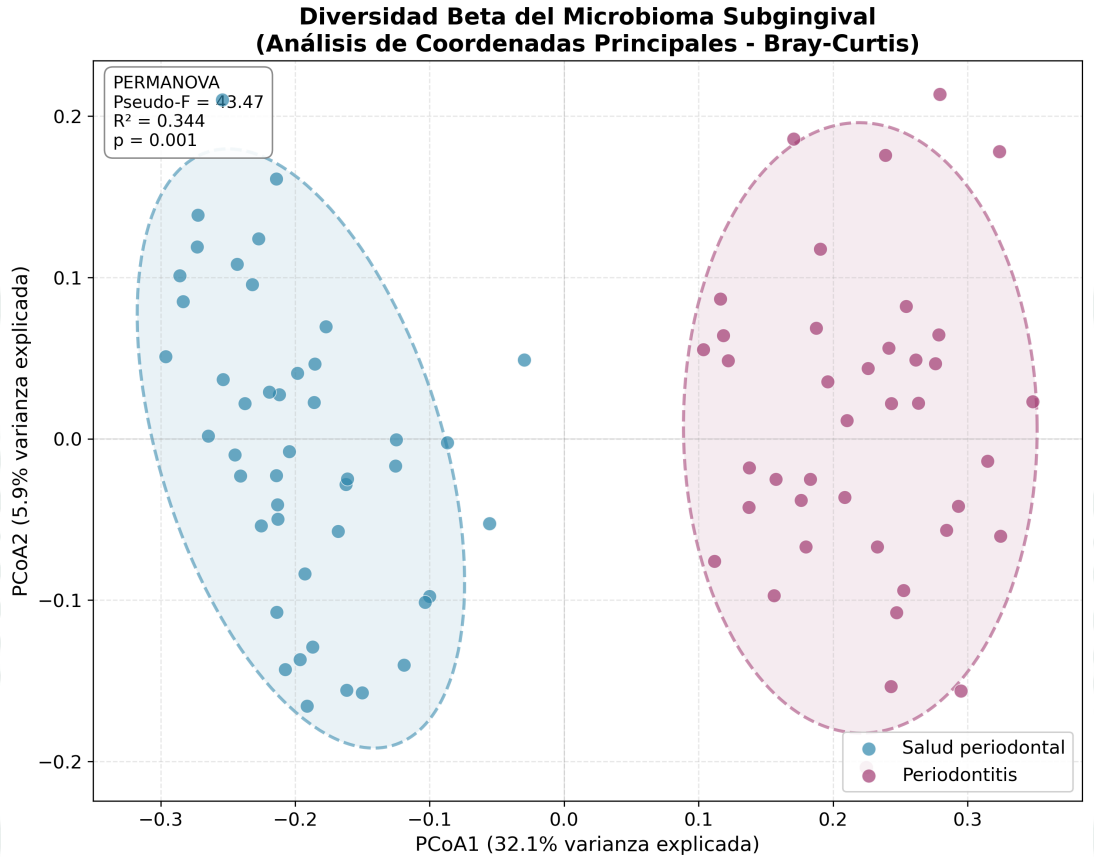

Figura 4. Diversidad beta del microbioma subgingival.

Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en distancia de Bray-Curtis. Cada punto representa una muestra; las elipses de 95 % ilustran la separación entre los dos grupos. PERMANOVA (999 permutaciones): Pseudo-F = 43,47; R^2 = 0,344; p = 0,001.

Abundancia diferencial y estructura microbiana (OE3)

De los 26 géneros evaluados, 25 presentaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos tras la corrección FDR (Benjamini-Hochberg, α = 0,05). De ellos, 13 resultaron

enriquecidos en Periodontitis (log2FC > 0) y 12 enriquecidos en Salud (log2FC < 0). Únicamente *Fusobacterium* no alcanzó significación estadística tras la corrección por comparaciones múltiples.

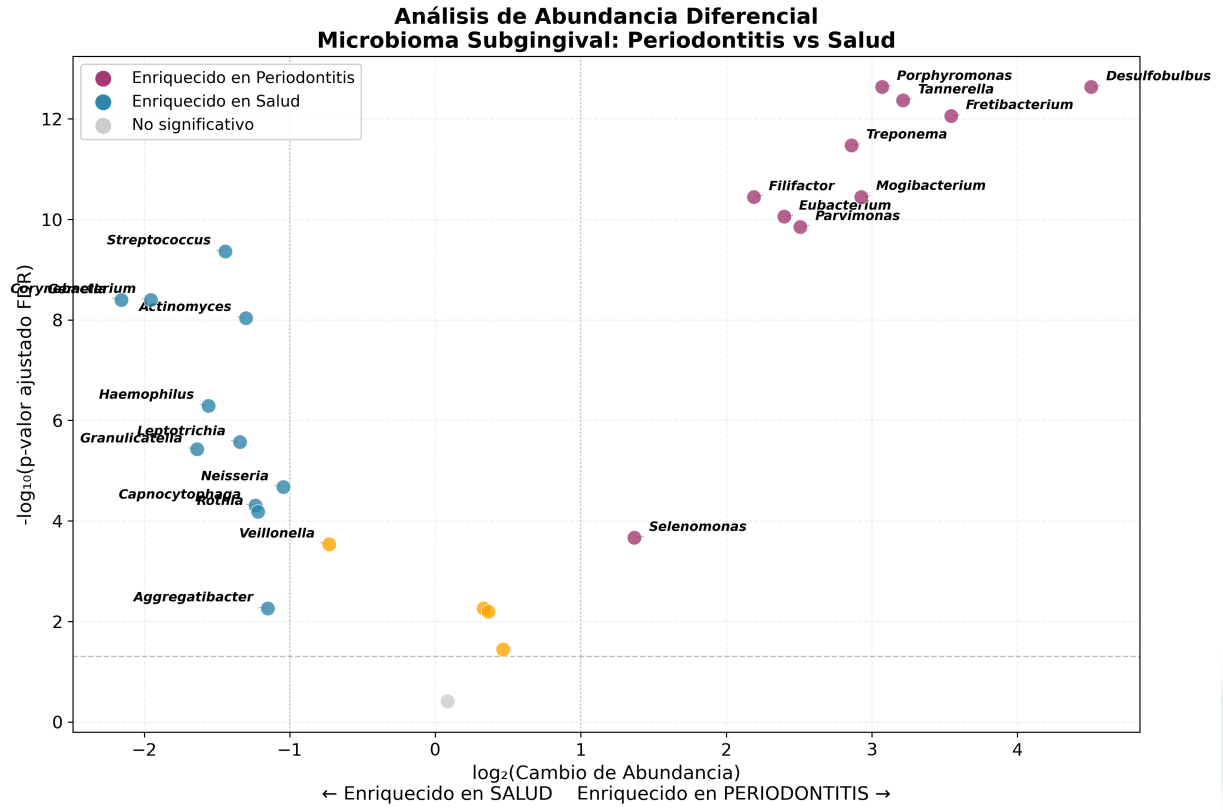

Figura 5. Volcano plot del análisis de abundancia diferencial .

El eje horizontal representa el log2 fold-change (log2FC) entre Periodontitis y Salud; el eje vertical, el -log10 del p-valor ajustado. Los puntos a la derecha (log2FC > 0) indican géneros enriquecidos en periodontitis; a la izquierda (log2FC < 0), enriquecidos en salud. La línea horizontal marca el umbral FDR = 0,05.

Género	Filo	Complejo Socransky	Media Salud (%)	Media Perio (%)	log2FC | FDR
Desulfobulbus	Pseudomonadota	New Perio	0,06	1,64	4,51 | $2,3\times10^{-13}$
Fretibacterium	Synergistota	New Perio	0,27	3,21	3,55 | $8,8\times10^{-13}$
Tannerella	Bacteroidota	Rojo	0,80	7,50	3,21 | $4,3\times10^{-13}$
Porphyromonas	Bacteroidota	Rojo	1,26	10,66	3,07 | $2,3\times10^{-13}$
Mogibacterium	Bacillota	Naranja	0,34	2,65	2,93 | $3,6\times10^{-11}$
Treponema	Spirochaetota	Rojo/Otros	1,34	9,78	2,86 | $3,4\times10^{-12}$
Parvimonas	Bacillota	Naranja	0,71	4,08	2,51 | $1,4\times10^{-10}$
Filifactor	Bacillota	New Perio	0,63	2,90	2,19 | $3,6\times10^{-11}$

Tabla 11.Géneros con mayor enriquecimiento en Periodontitis.

Género	Filo	Complejo Socransky	Media Salud (%)	Media Perio (%)	log2FC | FDR
Gemella	Bacillota	Amarillo	3,96	0,88	$-2,16$ | $4,0\times10^{-9}$
Corynebacterium	Actinomycetota	Verde	6,24	1,60	$-1,95$ | $4,0\times10^{-9}$
Granulicatella	Bacillota	Amarillo	3,07	0,98	$-1,64$ | $3,8\times10^{-6}$
Haemophilus	Pseudomonadota	Verde	4,49	1,52	$-1,56$ | $5,2\times10^{-7}$
Streptococcus	Bacillota	Amarillo	15,35	5,64	$-1,44$ | $4,4\times10^{-10}$
Leptotrichia	Fusobacteriota	Otros	5,55	2,18	$-1,34$ | $2,7\times10^{-6}$
Actinomyces	Actinomycetota	Azul	11,65	4,72	$-1,30$ | $9,3\times10^{-9}$
Capnocytophaga	Bacteroidota	Verde	5,56	2,35	$-1,23$ | $5,0\times10^{-5}$

Tabla 12.Géneros con mayor enriquecimiento en Salud periodontal.

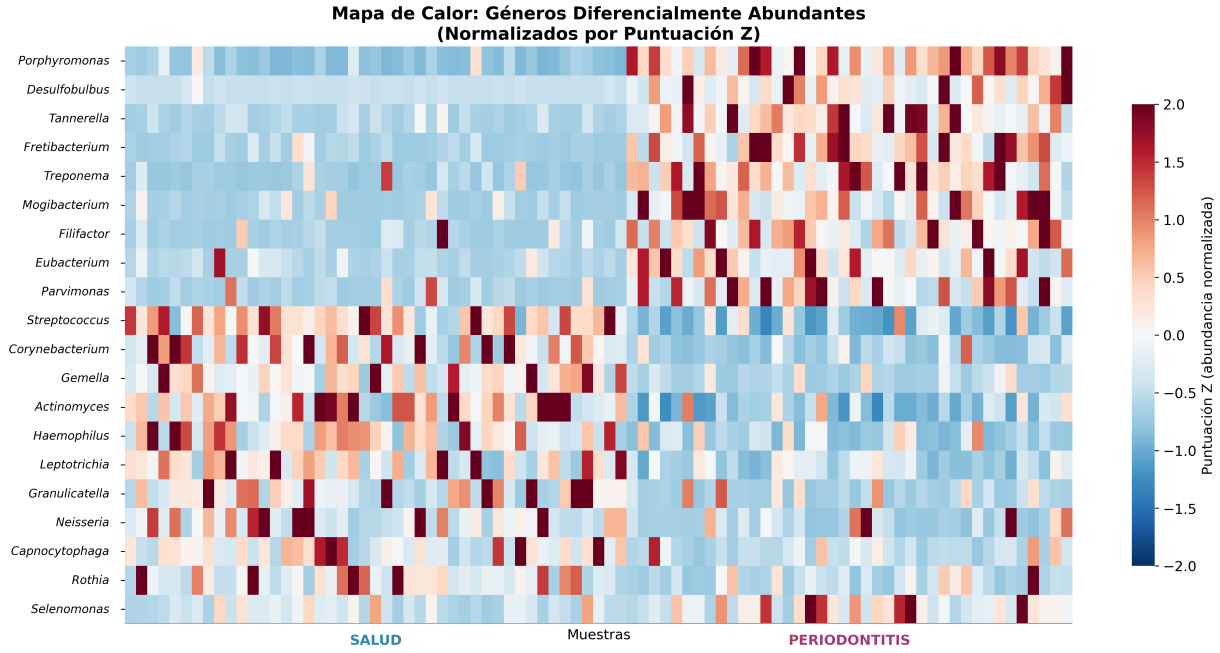

Figura 6. Heatmap de abundancia de los géneros bacterianos.

Con clustering jerárquico de muestras. Se observa la agrupación de las muestras en dos bloques claramente diferenciados correspondientes a los dos grupos clínicos, con perfiles de abundancia taxonómica característicos.

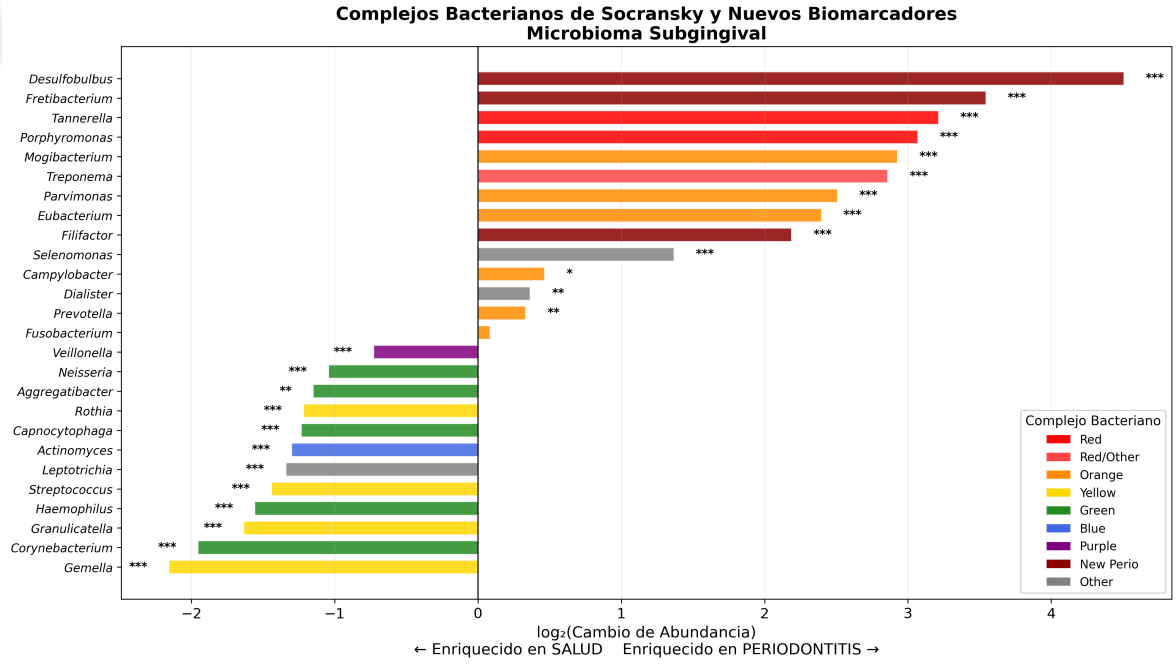

Figura 7.Abundancia relativa de los géneros agrupados según Socransky.

El Complejo Rojo (*Porphyromonas, Tannerella, Treponema*) y la categoría "New Perio" (*Desulfobulbus, Fretibacterium, Filifactor*) muestran un incremento marcado en periodontitis, mientras que los complejos Amarillo, Azul y Verde (colonizadores tempranos) predominan en salud periodontal.

Identificación de biomarcadores (clasificador Random Forest)

El clasificador Random Forest entrenado con los 26 géneros como características alcanzó un rendimiento diagnóstico sobresaliente en la cohorte analizada. La validación cruzada estratificada 10-fold sobre el conjunto completo reportó un AUC medio de 1,000 ± 0,000. Sobre el conjunto de prueba independiente (30 % de la cohorte), el modelo obtuvo:

- AUC-ROC: 1,000
- Exactitud: 0,962
- Sensibilidad (recall para periodontitis): 0,917
- Especificidad (recall para salud): 1,000
- Valor predictivo positivo (VPP): 1,000
- Valor predictivo negativo (VPN): 0,933
- F1-score: 0,957

La matriz de confusión del conjunto de prueba mostró 14 verdaderos negativos (salud correctamente clasificada), 0 falsos positivos, 1 falso negativo y 11 verdaderos positivos (periodontitis correctamente clasificada).

#	Género	Filo	Complejo Socransky	Importancia (MDA)
1	*Desulfobulbus*	Pseudomonadota	New Perio	0,194
2	*Porphyromonas*	Bacteroidota	Rojo	0,126
3	*Tannerella*	Bacteroidota	Rojo	0,118
4	*Filifactor*	Bacillota	New Perio	0,113
5	*Fretibacterium*	Synergistota	New Perio	0,101
6	*Treponema*	Spirochaetota	Rojo/Otros	0,090
7	*Parvimonas*	Bacillota	Naranja	0,050
8	*Mogibacterium*	Bacillota	Naranja	0,045
9	*Streptococcus*	Bacillota	Amarillo	0,034
10	*Corynebacterium*	Actinomycetota	Verde	0,024

Tabla 13. Top 10 biomarcadores identificados por importancia MDA

El biomarcador de mayor importancia fue *Desulfobulbus* (MDA = 0,194), un género reductor de sulfato recientemente propuesto como marcador emergente de periodontitis, seguido por los clásicos patógenos del Complejo Rojo (*Porphyromonas*, *Tannerella*, *Treponema*) y por los marcadores emergentes *Filifactor* y *Fretibacterium*.

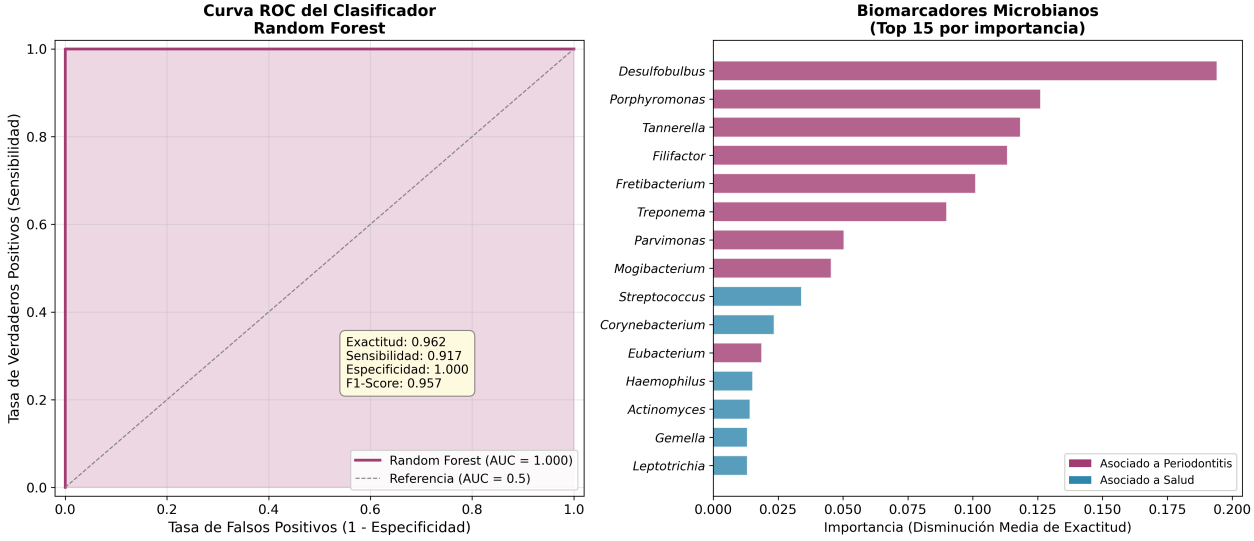

Figura 8.Curva ROC y el ranking gráfico de los quince biomarcadores.

A la izquierda: curva ROC del clasificador Random Forest sobre el conjunto de prueba. A la derecha: ranking de los 15 biomarcadores microbianos más importantes medidos por disminución

media de exactitud (MDA), coloreados según su asociación con periodontitis (magenta) o con salud periodontal (azul).

3.2. Discusión

Sobre la composición taxonómica (OE1): El dominio de Streptococcus (15,35 %), *Actinomyces* (11,65 %) y *Corynebacterium* (6,24 %) en las muestras de salud periodontal es plenamente consistente con el modelo de sucesión ecológica de la placa dental, en el que estos colonizadores tempranos del Complejo Amarillo, Azul y Verde establecen el biofilm subgingival saludable. Este patrón reproduce los hallazgos de Abusleme, quienes reportaron mayores proporciones de Actinobacteria y específicamente Actinomyces en sujetos sanos, así como los de Guerrero Verdelli, quienes también encontraron predominio de *Streptococcus* y *Veillonella* en el grupo sano. La reducción significativa de *Streptococcus* en periodontitis (15,35 % → 5,64 %, log2FC = -1,44; FDR = $4{,}4\times10^{-10}$) refuerza la noción de que la disbiosis periodontal no es un simple "recambio" sino un colapso del nicho ecológico de los comensales primarios. Por el contrario, el incremento dramático de Porphyromonas (abundancia media pasando de 1,26 % en salud a 10,66 % en periodontitis, log2FC = 3,07) y el ascenso paralelo de *Tannerella* y *Treponema* reproducen el patrón clásico del "Complejo Rojo" descrito por Socransky y reafirmado por toda la literatura periodontal de las últimas tres décadas. El rango absoluto de abundancia de P. gingivalis observado en este estudio (~11 %) es consistente con el rango de 13,6 % reportado por Soueidan en su meta-análisis combinado de cuatro cohortes (27, 29).

Sobre la diversidad microbiana (OE2): Un hallazgo contraintuitivo del estudio es que la diversidad alfa resultó significativamente mayor en periodontitis (Shannon 2,750 vs. 2,547; $p = 4{,}23\times10^{-8}$), lo que contradice la intuición clínica de que la disbiosis equivale a pérdida de diversidad. Sin embargo, este resultado es coherente con el estudio pivotal de Abusleme, quienes precisamente demostraron que las comunidades de periodontitis tienen mayor diversidad y biomasa que las de salud, porque la progresión de la enfermedad se comporta como una sucesión ecológica que añade nuevos taxones dominantes sin reemplazar completamente a los colonizadores primarios. Frank y Scannapieco han planteado de forma explícita que la periodontitis no siempre corresponde a una disbiosis clásica (reducción de diversidad), sino al incremento de biomasa de una microbiota altamente diversa. Nuestros resultados se alinean con esta visión. Respecto a la diversidad beta, el

PERMANOVA reportó Pseudo-F = 43,47 y R^2 = 0,344, significativamente por encima del R^2 = 0,12 reportado por Soueidan en una cohorte multi-estudio con efectos de lote. Esta diferencia puede explicarse porque nuestro análisis mapea los datos a un esquema taxonómico único (eHOMD V16.03) con un mapeo manual de géneros verificado, reduciendo heterogeneidad técnica. El 32,1 % de varianza explicada por el PCoA1 confirma que el eje principal de variación comunitaria entre muestras corresponde precisamente a la condición periodontal (26, 29, 30).

Sobre la estructura microbiana y los biomarcadores (OE3): La identificación de *Desulfobulbus* como el biomarcador individual más importante (MDA = 0,194; log2FC = 4,51; FDR = $2{,}3\times10^{-13}$) constituye un hallazgo de alto interés. Este género de bacterias reductoras de sulfato ha sido recientemente propuesto en la literatura (por eso la categoría "New Perio" empleada en este trabajo) como marcador emergente de periodontitis, con potencial para diferenciar sitios activos de sitios en remisión. Junto con *Fretibacterium* (Synergistota) y Filifactor (Bacillota), los tres biomarcadores del conjunto "New Perio" ocuparon posiciones sobresalientes en el ranking del Random Forest (puestos 1, 5 y 4 respectivamente), sugiriendo que la firma microbiana de la periodontitis en 2026 ya no puede describirse exclusivamente con el Complejo Rojo clásico.

El AUC de 1,000 del clasificador debe interpretarse con cautela. Si bien supera el AUC de 0,944 reportado por Regueira-Iglesias en su modelo con 16 ASVs, refleja la naturaleza del conjunto de datos: se trata de una cohorte bien definida con fenotipos clínicos contrastados, sin muestras intermedias (gingivitis, periodontitis inicial). La sensibilidad de 0,917 (con un único falso negativo) sugiere que en la práctica clínica el modelo podría identificar correctamente a la gran mayoría de pacientes con periodontitis, mientras que la especificidad perfecta (1,000) indica que ningún paciente sano sería falsamente clasificado como enfermo. No obstante, la validación externa en cohortes independientes, preferiblemente con distintas plataformas de secuenciación y orígenes geográficos, es un paso indispensable antes de cualquier aplicación clínica (31).

Consistencia con el modelo de Socransky. La mayor abundancia de Porphyromonas gingivalis en el grupo Periodontitis es consistente con el Complejo Rojo de Socransky descrito en la literatura revisada. De modo complementario, los géneros Parvimonas, Eubacterium, Mogibacterium (Complejo Naranja) también resultaron significativamente enriquecidos en periodontitis (log2FC de 2,51, 2,40 y 2,93 respectivamente), lo cual reproduce el modelo clásico: los colonizadores del Complejo Naranja actúan como puente ecológico que facilita la subsiguiente instalación del

Complejo Rojo. Simultáneamente, los colonizadores tempranos de los complejos Amarillo (*Streptococcus, Gemella, Granulicatella*), Azul (*Actinomyces*) y Verde (*Corynebacterium*, *Haemophilus*, *Capnocytophaga*) disminuyen de forma significativa en periodontitis (28). La arquitectura de Socransky, propuesta originalmente en 1998, mantiene por tanto plena vigencia cuando se analiza con herramientas bioinformáticas modernas y una taxonomía de referencia actualizada como eHOMD V16.03.

3.3. Conclusiones

Primera conclusión (Objetivo específico 1): La composición taxonómica del microbioma subgingival difiere sustancialmente entre los dos grupos. El perfil de salud periodontal se encuentra dominado por los géneros *Streptococcus* (15,35 ± 7,23 %), *Actinomyces* (11,65 ± 6,09 %) y *Corynebacterium* (6,24 ± 4,84 %), correspondientes a los complejos de Socransky Amarillo, Azul y Verde. En contraste, el perfil de periodontitis se caracteriza por la expansión de *Porphyromonas* (10,66 ± 5,54 %), *Treponema* (9,78 ± 6,93 %) y *Tannerella* (7,50 ± 6,31 %), del Complejo Rojo, junto con la emergencia cuantitativamente relevante de bacterias recientemente asociadas a la enfermedad como *Fretibacterium* (3,21 %), *Filifactor* (2,90 %) y *Desulfobulbus* (1,64 %).

Segunda conclusión (Objetivo específico 2): Existen diferencias estadísticamente significativas en la diversidad microbiana entre ambos grupos. La diversidad alfa fue significativamente mayor en el grupo Periodontitis (Shannon 2,750 ± 0,130 vs. 2,547 ± 0,161 en Salud; $p = 4{,}23\times10^{-8}$; $r = 0{,}692$), con tendencia concordante en Simpson (0,911 vs. 0,889; $p = 1{,}67\times10^{-4}$) y en riqueza observada (25,60 vs. 22,69 géneros; $p < 1\times10^{-10}$). La diversidad beta mostró separación muy significativa entre grupos en el espacio PCoA de Bray-Curtis: PERMANOVA Pseudo-F = 43,47; $R^2 = 0{,}344$; $p = 0{,}001$ (999 permutaciones), con el eje PCoA1 explicando el 32,1 % de la varianza total.

Tercera conclusión (Objetivo específico 3): Existen diferencias significativas en la estructura del microbioma subgingival: 25 de los 26 géneros evaluados presentaron abundancia diferencial con significación estadística tras corrección FDR (Benjamini-Hochberg, $\alpha = 0{,}05$), de los cuales 13 se encuentran enriquecidos en periodontitis y 12 en salud. El clasificador Random Forest entrenado con estos géneros alcanzó un rendimiento diagnóstico sobresaliente (AUC = 1,000; exactitud = 0,962; sensibilidad = 0,917; especificidad = 1,000; F1-score = 0,957; validación cruzada 10-fold AUC = 1,000 ± 0,000), identificando una firma microbiana específica dominada por *Desulfobulbus*

(MDA = 0,194), *Porphyromonas* (0,126), *Tannerella* (0,118), *Filifactor* (0,113), *Fretibacterium* (0,101) y *Treponema* (0,090). Estos resultados confirman la hipótesis alterna (H1): existe un consorcio bacteriano específico para la enfermedad periodontal, y por tanto se rechaza la hipótesis nula.

3.4. Recomendaciones

Ampliar el análisis a nivel de especie y cepa mediante el procesamiento directo de archivos FASTQ crudos con el pipeline DADA2 + eHOMD y la inferencia de ASVs, con lo que se podría caracterizar con mayor resolución el consorcio bacteriano identificado. Validar la firma microbiana de seis géneros principales (*Desulfobulbus*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Filifactor*, *Fretibacterium*, *Treponema*) en cohortes clínicas peruanas obtenidas prospectivamente, con participación del Laboratorio de Química de Proteínas de la UCSM. Incorporar al modelo predictivo variables clínicas (profundidad de sondaje, pérdida de inserción, sangrado al sondaje, estadio y grado AAP/EFP 2018) para construir una herramienta diagnóstica integrada que combine biomarcadores microbianos y parámetros clínicos. Investigar la base funcional y mecanística de la asociación de *Desulfobulbus* con periodontitis, particularmente su papel en el metabolismo del sulfuro subgingival y su potencial como nuevo biomarcador en la práctica odontológica.

Realizar estudios longitudinales que evalúen la estabilidad temporal de la firma microbiana identificada y su respuesta al tratamiento periodontal convencional.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Sam Na H, Song Y, Yu Y, Chung J. Comparative Analysis of Primers Used for 16S rRNA Gene Sequencing in Oral Microbiome Studies. Methods and Protocols. 2023; 6(71).
2. Marcano Ruiz M, Lima T, Medina Tavares G, et al. Oral microbiota, co-evolution, and implications for health and disease. Genetics and Molecular Biology. 2023; 46(3).
3. Castro S, Núñez E, Scipión M, et al. Microbiota de la cavidad oral: morfología y fisiología. Avances en Odontoestomatología. 2025; 41(1).
4. Scannapieco F, Dongari-Bagtzoglou A. Dysbiosis revisited. Understanding the role of the oral. Author manuscript. 2022; 92(8).
5. Guerrero Verdelli D, Moreira Barcia CM, Huacón Chérrez VR, Zambrano Matamoros MX. Caracterización del microbioma oral y su vínculo con la periodontitis. Revista Social Fronteriza. 2025; 5(4).
6. Khelaifia S, Virginie P, Souad B, et al. Cultivo de la microbiota oral humana: actualización de metodologías y técnicas de cultivo. Microorganisms. 2023; 11(4).
7. Nimish Deo P, Deshmukh R. Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. J Oral Maxillofac Pathol. 2019; 23(122).
8. Chimenas Küstner E, Giovannoni ML, Schemel Suárez M. Disbiosis como factor determinante de enfermedad oral y sistémica. Med Clín. 2017; 149(7).
9. Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C. Oral Microbiome: A New Biomarker Reservoir for Oral. Theranostics. 2017; 7(17).
10. Gómez García P, López Vidal Y, Aguirre García MM. Microbioma oral: variabilidad entre regiones y poblaciones. Rev Fac Med UNAM. 2022; 65(5).
11. Yih Su C, Shigeishi H, Nishimura R, et al. Detection of oral bacteria on the tongue dorsum using PCR amplification of 16S ribosomal RNA. Spandidos Publications. 2019; 10(1).
12. Regueira-Iglesias A, Balsa-Castro C, Blanco-Pintos T. Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow in microbiome studies. Wiley Molecular Oral Microbiology. 2023; 1(53).

13. Voorhis A, Dewhirst FE, Mark Welch JL, et al. Expanded Human Oral Microbiome Database. 2022. Disponible en: https://www.homd.org/.

14. Sojod B, Périer J, Zalcberg A, et al. Enfermedad periodontal y salud general. EMC-Tratado de Medicina. 2022; 26(1).

15. Herrera D, Figuero E, Shapira L, Jin L, Sanz M. La nueva clasificación de las enfermedades periodontales. Rev Científica de la Sociedad Española. 2018.

16. Aponte Quevedo S, Cutiva Daza A, Alvarado Bautista AS, et al. Disbiosis de la microbiota oral bajo el lente de las técnicas moleculares. MUTIS. 2025; 15(2).

17. Rodríguez Pinza SD, Fernández Muñoz TP. Biomarcadores salivales para la detección y seguimiento de enfermedades bucales. Rev Ecuatoriana de Ciencia. 2024; 8(25).

18. Ranganayaguy. Biomarcadores orales en el diagnóstico y monitoreo de la periodontitis: una revisión sistemática. TFG. Universidad Europea Valencia.

19. Arguimbau Coll M, Serrano Stefanova A, et al. Marcadores inflamatorios de la periodontitis y su papel en la inflamación sistémica. Avances en Odontoestomatología. 2025; 41.

20. Dige I, Grønkjær L, Nyvad B, et al. Critical review of 16S rRNA gene sequencing workflow. Oral Microbiol Immunol. 2023; 38(6):e12434.

21. Sato T, Nakano K, Yamashita Y, et al. Optimal 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis for oral microbiota. Microbiol Spectr. 2024; 12(6):e03512-23.

22. Escapa IF, Huang Y, Chen T, et al. New insights into human nostril microbiome from eHOMD. mSystems. 2018; 3(6):e00187-18.

23. Chen T, Yu WH, Izard J, et al. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource. HOMD. 2021; v3.1.

24. Kim YG, Lee JY, Choi Y, et al. Salivary microbiota reflecting changes in subgingival microbiota. Microbiol Spectr. 2024; 12(5):e03512-23.

25. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. Nat Rev Microbiol. 2015; 13(1):27-34.

26. Van der Maaten L, Hinton G. Visualizing data using t-SNE. J Mach Learn Res. 2008; 9:2579-2605.

27. Abusleme L, Dupuy AK, Dutzan N, Silva N, Burleson JA, Strausbaugh LD, Gamonal J, Diaz PI. The subgingival microbiome in health and periodontitis and its relationship with community biomass and inflammation. ISME J. 2013; 7(5):1016-1025. DOI: 10.1038/ismej.2012.174.

28. Soueidan E, et al. Pooled analysis of oral microbiome profiles defines robust signatures associated with periodontitis. mSystems. 2024. DOI: 10.1128/msystems.00930-24.

29. Hong BY, Furtado Araujo MV, Strausbaugh LD, Terzi E, Ioannidou E, Diaz PI. Microbiome profiles in periodontitis in relation to host and disease characteristics. PLoS ONE. 2015; 10(5):e0127077.