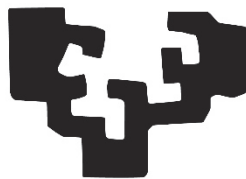


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## TESIS DOCTORAL

### **Análisis genético, citológico y micológico en pacientes diagnosticados de Peri-implantitis de la Comunidad Autónoma del País Vasco**

Irene Lafuente Ibáñez de Mendoza

Programa de Doctorado Inmunología, Microbiología y Parasitología

Departamento de Estomatología II

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

2022

Directores:

Profesor José Manuel Aguirre Urizar

Profesor Xabier Marichalar Mendia



## ÍNDICE

1. Introducción .....	7-12
1.1. Hipótesis .....	11-12
1.2. Objetivos .....	12
2. Antecedentes .....	14-41
2.1. La enfermedad peri-implantaria .....	14-22
2.2. La susceptibilidad genética en la enfermedad peri-implantaria .....	23-29
2.3. La citología exfoliativa en la enfermedad peri-implantaria .....	30-33
2.4. <i>Candida spp.</i> en la enfermedad peri-implantaria .....	34-41
3. Material y Métodos .....	43-68
3.1. Pacientes .....	43-47
3.1.1. Criterios de inclusión y exclusión .....	43-45
3.1.2. Protocolo clinicopatológico .....	46-47
3.2. Recogida de las muestras .....	48-66
3.2.1. Muestra para el análisis genético .....	48-56
3.2.1.1. Toma de la muestra genética .....	48
3.2.1.2. Análisis de la muestra genética .....	49-56
3.2.2. Muestra para el análisis citológico .....	57-60
3.2.2.1. Toma de la muestra citológica .....	57-58
3.2.2.2. Análisis de la muestra citológica .....	58-59
3.2.2.3. Protocolo de identificación de elementos citológicos.....	59-60
3.2.3. Muestra para el análisis micológico .....	61-66
3.2.3.1. Toma de la muestra micológica .....	61
3.2.3.2. Análisis de la muestra micológica .....	62-66
3.3. Análisis estadístico .....	67-68
4. Resultados .....	70-107

4.1. Pacientes .....	70-76
4.1.1. Datos generales .....	70-71
4.1.2. Datos clínicos orales .....	71-72
4.1.3. Datos clínicos de los implantes .....	72-76
4.2. Estudio genético .....	77-81
4.2.1. Análisis general .....	77-78
4.2.2. Análisis genético y factores de riesgo .....	79-81
4.3. Estudio citológico .....	82-95
4.3.1. Análisis general .....	82-90
4.3.1.1. Cantidad de material .....	82
4.3.1.2. Células epiteliales escamosas .....	82-84
4.3.1.3. Detritus .....	85
4.3.1.4. Microbiota .....	86-87
4.3.1.5. Hematíes .....	88
4.3.1.6. Células inflamatorias .....	88-90
4.3.2. Análisis citológico y datos clínicos .....	91-93
4.3.3. Análisis de sensibilidad y especificidad .....	94-95
4.4. Estudio micológico .....	96-104
4.4.1. Análisis general .....	96-101
4.4.1.1. Muestra de enjuague oral .....	96-97
4.4.1.2. Muestra de puntas de papel .....	98-101
4.4.2. Análisis micológico, datos clínicos y datos citológicos .....	102-104
4.5. Regresión logística binaria .....	105-107
5. Discusión .....	109-131
5.1. En relación con los aspectos epidemiológicos y clínicos .....	109-112



5.2. En relación con los resultados genéticos .....	113-118
5.3. En relación con los resultados citológicos .....	119-127
5.4. En relación con los resultados micológicos .....	128-131
6. Conclusiones .....	136-187
7. Bibliografía .....	189-193
8. Abreviaturas .....	179-182
9. Apéndices .....	195-219
9.1. Artículo 1. Lafuente-Ibañez de Mendoza I, Setien-Olarrá A, Aguirre-Urizar JM, Marichalar-Mendia X. Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis. Int J Implant Dent 2022;8(1):1-9. ....	195-204
9.2. Artículo 2. Lafuente-Ibañez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar J. A systematic review on the implication of <i>Candida</i> in peri-implantitis. Int J Implant Dent 2021; 7(1):1-9. ....	205-214
9.3. SNP de proteínas no específicas incluidos en el <i>array</i> : Análisis comparativo por grupos .....	215-217
9.4. SNP de proteínas de la respuesta inflamatoria y el remodelado óseo. Análisis por factores de riesgo: Antecedente de periodontitis .....	218
9.5. Análisis de correlación entre las diferentes variables citológicas .....	219



## 1. INTRODUCCIÓN

La salud oral es un claro indicador de la calidad de vida en el ser humano (Petersen, 2003). Los primeros indicios de una terapia dental se remontan al periodo Paleolítico Superior Tardío (9000 a.C.), y aparecen en restos homínidos que muestran patología cariogénica e intentos reparativos (Lukas y Pastor 1988; Oxilia et al., 2015). No obstante, los primeros tratados sobre trastornos orales, incluida la periodontitis, datan de la antigua Grecia (1200 aC-146 a.C.) (Güven, 2017).

Mucho después (600 d.C), los aborígenes mayas en Centroamérica empezaron a reemplazar los dientes perdidos por conchas (Malvin, 1985); aunque no fue hasta finales del siglo XVIII, cuando el Dr. Hunter empezó a colocar dientes de cadáver en lechos edéntulos (Milton, 1988).

Los primeros implantes dentales metálicos (iridio-platino) se inventaron a principios del siglo XX (1913) por el Dr. Greenfield (Greenfield, 1991), siendo posteriormente sustituidos por aleaciones de cromo-cobalto y acero inoxidable por los hermanos Strock (1930) (Abraham, 2014).

La implantología moderna tal y como la conocemos hoy en día, surge en 1965 cuando el Profesor Brånemark coloca el primer implante roscado de titanio (Brånemark, 1977). Esta nueva terapia promovió el concepto de la “osteointegración”, que se define como: *una conexión estructural y funcional directa entre el hueso vivo ordenado y la superficie de un implante portador de carga* (Brånemark, 1985). Desde ese momento, se han desarrollado múltiples sistemas de implantes dentales con diferentes materiales, para mejorar su comportamiento biológico y funcional, así como la calidad de vida de los pacientes con pérdida dental.

En la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) la instauración del Programa de Asistencia Dental Infantil (PADI), junto a la fluorización del agua de consumo, ha producido una reducción sustancial de la prevalencia de la patología infecciosa cariogénica, pero la enfermedad periodontal se mantiene (Gobierno Vasco, 2019). Bajo la denominación de “enfermedad periodontal” se agrupan un conjunto de trastornos que afectan al periodonto, tanto a los tejidos blandos como a los duros. La última reunión de consenso de la Academia Americana de Periodoncia y la Federación Europea de Periodoncia celebrada en Chicago en 2017, considera a la periodontitis como una enfermedad infecciosa de carácter multifactorial que afecta a más del 50% de la población, y provoca la pérdida ósea alrededor de los dientes que conduce al edentulismo (Caton et al., 2018).

Actualmente se estima que el 25,5% de la población española mayor de 65 años conserva la mitad de sus dientes en boca y el 11,6% sufre edentulismo completo (Bravo Pérez et al., 2020). La Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2019) señala que la esperanza de vida media en España es de 82 años. Estos datos subrayan la importancia que todavía mantiene la salud oral, su diagnóstico, tratamiento y control, como elemento relevante en la valoración de la calidad de vida de los españoles adultos.

El Informe sobre Salud Bucodental en el Mundo de la OMS (Petersen, 2003) destaca el importante papel de la salud oral en la calidad de vida general de los humanos: “El complejo craneofacial nos permite hablar, sonreír, besar, tocar, oler, saborear, masticar, tragar y gritar de dolor. Además, proporciona protección contra infecciones microbianas y amenazas ambientales. Las enfermedades bucales restringen la actividad en la escuela, en el trabajo y en el hogar, lo que hace que cada año se pierdan millones de horas de estudio y de trabajo en todo el mundo. Además, el impacto psicosocial de estas enfermedades a menudo disminuye significativamente la calidad de vida de las personas”.

El principal objetivo del tratamiento rehabilitador con implantes dentales es devolver la función bucal a los pacientes edéntulos, mediante un sistema fijo y estable. Sin embargo, esta terapéutica no está exenta de efectos adversos, que limitan en gran medida la calidad de vida de los pacientes rehabilitados; siendo la peri-implantitis (PI) la complicación biológica más importante.

La peri-implantitis es un trastorno multifactorial perteneciente al grupo de las “Condiciones y Enfermedades Peri-implantarias”, que afecta hasta el 50% de implantes dentales, y condiciona la pérdida del soporte óseo maxilar; lo que en muchos casos condiciona el fracaso del tratamiento rehabilitador (Zitzmann y Berglundh, 2008; Schwarz et al., 2018). Todavía no se conocen los factores etiopatogénicos involucrados en esta importante patología peri-implantaria, más allá de su patogenia infecciosa microbiana, parcialmente reconocida, o de los factores de riesgo del paciente, como el antecedente de periodontitis, el consumo de tabaco o el padecimiento de diabetes mellitus (Schwarz et al., 2018).

El diagnóstico actual de la peri-implantitis es clínico-radiológico e incluye: la presencia de sangrado y/o supuración tras un sondaje delicado, una profundidad de sondaje peri-implantario de más de 6 mm y niveles óseos mayores a 3 mm en el componente intraóseo del implante. No obstante, las diferencias subjetivas en la evaluación de estos parámetros y los cambios en la definición de la PI, han dificultado en gran medida su diagnóstico (Zitzmann y Berglundh, 2008; Lang y Berglundh, 2011; Rosen et al., 2013, Albrektsson et al., 2016; Tarnow, 2016).

La evidencia científica afirma que el acúmulo de placa bacteriana y un historial previo de periodontitis son los factores de riesgo más importantes para la PI (Renvert y Quirynen, 2015). Sin embargo, no todos los individuos expuestos a estas condiciones la desarrollan;

por lo que se ha señalado la posible existencia de un fenómeno de susceptibilidad genética que contribuiría a su desarrollo (Esposito et al., 1998; Laine et. al 2006; Eguia et al., 2018; Lafuente-Ibáñez de Mendoza et al., 2022).

Por todo ello, obtener datos sobre la etiopatogenia de este frecuente trastorno y mejorar su diagnóstico nos permitiría identificar a los pacientes de riesgo para padecer PI, y realizar su diagnóstico precozmente. Además, nos ayudaría a prevenir la aparición de PI, establecer medidas terapéuticas más efectivas, y con todo ello mejorar la calidad de vida de los pacientes tratados con implantes dentales.

## 1.1. Hipótesis

Se han realizado escasos estudios en España, y ninguno en el País Vasco, tratando de reconocer la existencia de un perfil específico de polimorfismos genéticos asociados a proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria y el remodelado óseo, que favorecería la aparición de PI.

Sabemos que la PI es una enfermedad infecciosa polimicrobiana en la que actúan un conjunto de agentes infecciosos, principalmente bacterianos como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella intermedia*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, etc. (Canullo et al., 2015; Shibli et al., 2007). No obstante, la acción de otros microorganismos poco estudiados también podría tener importancia, incluidos los fúngicos (Alcoforado et al., 1991). El surco peri-implantario puede ser un nicho perfecto para la colonización del hongo *Candida spp.* (Alrabiah et al., 2019); por lo que consideramos que puede ser interesante conocer su papel en la patogenia de esta enfermedad.

El estudio citológico de la mucosa peri-implantaria nos permitiría conocer la cantidad y calidad de la colonización microbiana, la cantidad y calidad la respuesta celular inflamatoria, el nivel de afectación del epitelio, la presencia de otros elementos, etc. (Patton et al., 2008, Pontoriero et al., 1995; Belibasakis, 2014; Tesis Doctoral Javier Vallejo, 2017). Esta sencilla metodología puede aportar información muy valiosa respecto del diagnóstico de la PI, de su progresión y control, e incluso sobre su patogenia.

Nuestra hipótesis de partida en este estudio es que la peri-implantitis tiene una etiopatogenia multifactorial, en la que existiría, en algunos casos, una susceptibilidad individual asociada a polimorfismos genéticos específicos relacionados con la inflamación y el remodelado óseo. Por otro lado, también intervendrían, junto a las bacterias peri-implantopatógenas clásicas, los hongos del género *Candida spp.* Además,

la citología obtenida de los tejidos peri-implantarios sería una metodología útil para el diagnóstico precoz y el control de la enfermedad peri-implantaria.

## **1.2. Objetivos**

Actualmente no existe ningún estudio que haya analizado de forma conjunta la presencia de polimorfismos genéticos específicos, la implicación patogénica de los hongos y el aspecto citológico, en el contexto de la peri-implantitis de la población de la CAPV.

- **Objetivo principal**

Investigar en población diagnosticada de peri-implantitis de la Comunidad Autónoma del País Vasco, la existencia de un patrón específico de polimorfismos genéticos, la presencia de *Candida spp.* como factor patogénico y la caracterización citológica de extendidos de la mucosa peri-implantaria afecta.

- **Objetivos secundarios**

1. Conocer la existencia de polimorfismos genéticos específicos relacionados con la inflamación y el remodelado óseo en la peri-implantitis, en esta población.
2. Conocer las características del análisis citológico de los tejidos peri-implantarios afectados de peri-implantitis, en esta población.
3. Conocer el nivel de colonización y la implicación de los hongos del género *Candida spp.* en la peri-implantitis, en esta población.
4. Relacionar los resultados obtenidos en los estudios genético, citológico y micológico, entre ellos y con los principales datos clínicos de la peri-implantitis presentes en nuestra población de estudio.



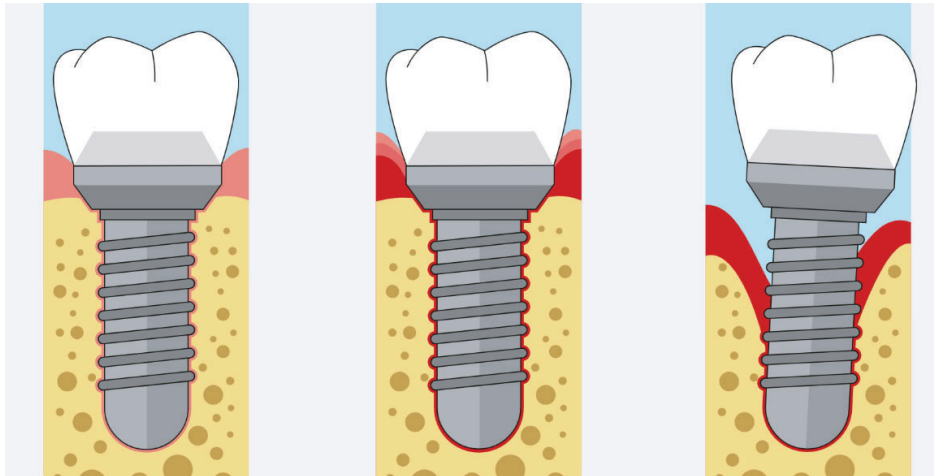


## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. La enfermedad peri-implantaria

En la actualidad se considera que las principales complicaciones biológicas asociadas a la terapia con implantes dentales son la mucositis (MPI) y la peri-implantitis (PI) (Lee et al., 2017).

De la misma manera que la gingivitis precede a la periodontitis en los pacientes con dientes, la MPI es un cuadro inflamatorio reversible que suele preceder a la PI y sólo afecta a los tejidos blandos peri-implantarios, por lo que tiene un fácil manejo terapéutico (Heitz-Mayfield y Salvi, 2018). Se ha considerado que la tasa de conversión de MPI en PI es del 18% en los pacientes que acuden a terapia de mantenimiento y del 43,9% en los que no lo hacen (Costa et al., 2012) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Esquema gráfico de las principales Condiciones y Enfermedades Peri-implantarias (Federación Europea de Periodoncia, 2022. <https://www.efp.org/dental-implants/peri-implant-diseases/> ). Salud peri-implantaria (izquierda), Mucositis peri-implantaria (Centro) y Peri-implantitis (Derecha).

El remodelado óseo que se desarrolla en el hueso maxilar que rodea los implantes dentales es una respuesta fisiológica adaptativa de reabsorción que también ocurre en otras partes

del organismo humano tras la realización de otras actuaciones terapéuticas (prótesis de cadera, de rodilla, etc.); y que puede alcanzar hasta 1,7 mm en condiciones normales (Steenberghe et al., 2011).

La unión entre el tejido conectivo y la mucosa peri-implantaria muestra características clínicas e histológicas similares a la que se produce alrededor de los dientes; presentando, no obstante, diferencias a nivel celular y fibrilar (Ivanovski y Lee, 2018). El tejido conectivo peri-implantario, en íntimo contacto con el material de Titanio, muestra una red de grandes haces densos colagénicos que se insertan en el margen de la mucosa desde el periostio de la cresta ósea (Ivanovski y Lee, 2018). La proyección y orientación de estas fibras en el epitelio de unión adopta un patrón perpendicular desde el cemento radicular en los dientes y paralelo en los implantes (Berglundh et al., 2004; Berglundh et al., 2011). Este cambio en la disposición de las fibras tiene una gran relevancia clínica, ya que la barrera biológica que permea el espacio perióstico frente a los agentes infecciosos de la cavidad oral, el epitelio de unión, está ausente en los implantes dentales (Shimono et al., 2003).

En un principio, los primeros casos de PI se definieron como “reacciones inflamatorias con pérdida del hueso de soporte en los tejidos que rodean un implante dental en funcionamiento” (Albrektsson y Isidor, 1994). Posteriormente, se fueron estableciendo diferentes factores de riesgo y criterios diagnósticos para la PI, como la pérdida ósea marginal (POM) y la profundidad de sondaje (PS) elevada (Ismael, 2001; Heitz-Mayfield 2008; Lindhe y Meyle 2008; Zitzmann y Berglundh 2008). También se señaló que la combinación del tratamiento quirúrgico (descontaminación de la superficie del implante) y no quirúrgico (uso de antibióticos), era la mejor herramienta terapéutica para este trastorno (Clarke et al., 2008; Renvert et al., 2008).

En el 7º *Workshop* de Periodoncia (2011) se consensuó por primera vez que, si bien la MPI es la contraparte peri-implantaria de la gingivitis, la PI es un proceso diferente a la periodontitis, tanto respecto de su gravedad como de su componente inflamatorio (Lang y Berglundh 2011). La extensión apical de las lesiones inflamatorias es mayor en la PI, con una mayor PS, y existen más células osteoclásticas e inflamatorias agudas (macrófagos y polimorfonucleares) que en la periodontitis (Heitz-Mayfield y Lang, 2010). Por ello, el factor de autolimitación protectora que está presente en la periodontitis, no existiría en la PI (Berglundh et al., 2011).

Actualmente se considera a la PI como un trastorno dentro del grupo denominado “Condiciones y Enfermedades Peri-implantarias”, que se caracteriza por la inflamación de la mucosa peri-implantaria y la pérdida progresiva del hueso de soporte (Schwarz et al., 2018). La PI es una enfermedad inflamatoria infecciosa de carácter multifactorial, sin preferencia de género, que afecta hasta el 50% de los pacientes tratados con implantes y en muchos casos condiciona el fracaso del tratamiento rehabilitador (Lindhe et al., 2008; Lang et al., 2011; Tomasi et al., 2012; Schwartz et al., 2018).

La colonización bacteriana de los implantes dentales ocurre poco tiempo después de su colocación (Apse et al.1989). Las primeras descripciones sobre la microbiota oral en pacientes con implantes dentales las realizaron el grupo de Periodoncia e Implantología de la Universidad de Filadelfia (Estados Unidos) a principios de los años 80, mediante estudios de microscopia de campo oscuro (Rams y Link, 1983). Este grupo demostró una clara diferencia entre las bacterias presentes en los implantes sanos (cocos) y los implantes con PI (espiroquetas) (Rams et al., 1984). Más tarde, el equipo de la Universidad de Gotemburgo (Suecia) también reconoció la presencia de una microbiota cocoide y bacilar no móvil en el 93-94% de los surcos peri-implantarios (Adell et al., 1986; Lekholm et al., 1986).

El perfil microbiológico asociado a los implantes dentales fue descrito en 1986 (Lekholm et al., 1986), correspondiendo en su mayoría a bacterias Gram positivas, cocos (*Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus acidominimus*) y bacilos (*Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*); junto a bacterias Gram negativas, cocos (*Veillonella parvula*) y bacilos (*Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*). Posteriormente, otros autores (Nakou et al., 1987; Apse et al., 1989) también reconocieron la presencia de otros peri-implantopatógenos específicos como *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* y *P. intermedia*. Mombelli et al., (1987) fueron los primeros investigadores en demostrar una mayor presencia de bacterias anaerobias Gram negativas como *Fusobacterium spp.*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* en los implantes que presentaban PI. Los resultados de Alcoforado et al., (1991) fueron similares, aislando por primera vez *Candida albicans* en pacientes con implantes que presentaban PI.

Las diferencias microbianas entre los implantes en salud y los que presentan PI se han ido caracterizando cada vez más con el paso de los años. Como hemos señalado, los implantes sanos presentan una mayor cantidad de bacterias Gram positivas (*Gemella morbillorum*, *S. sanguis*, *Actinomyces spp.*), y los afectados por PI presentan otros microorganismos específicos (*Prevotella nigrescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Tannerella forsythia*, *Mycoplasma salivarium*, etc.) (Becker et al., 1990; Rosenberg et al., 1991; Danser et al., 1997; Listgarten et al., 1999; Hultin et al., 2002; Schwarz et al., 2015). También se han descrito diferencias en los complejos “verde” (*A. actinomycetemcomitans*), “naranja” (*F. nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*), en el “rojo” (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*), “amarillo” (*Streptococcus gordonii*, *S. sanguinis*) y “morado” (*V. parvula*) (Canullo et al., 2015). La presencia del complejo rojo

y naranja es más alta en la PI, y la del morado y el verde en los implantes sanos (Shibli et al., 2007).

Toda esta investigación ha demostrado que la PI es un trastorno infeccioso polimicrobiano en el que actúan, de manera sinérgica, un conjunto de agentes infecciosos: *P. gingivalis*, *Staphylococcus aureus*, *T. forsythia*, *P. nigrescens*, *Treponema socranskii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus midis*, *Haemophilus influenzae* (Salvi et al., 2007; Charalampakis et al., 2012; Persson y Renvert, 2013). Además, se han identificado combinaciones de patógenos específicos en los implantes con PI (*P. gingivalis* + *T. forsythia* + *T. denticola*, *M. salivarium* + *V. parvula*, + *P. gingivalis* + *P. micra*) (Albertini et al., 2015; Schwarz et al., 2018). A pesar de ello, todavía no se ha demostrado un perfil microbiano específico asociado a la PI; y la presencia bacteriana, comparativamente con la observada en los dientes afectados de periodontitis, es menor (Padiál-Molina et al., 2016).

Este complejo proceso infeccioso peri-implantario condiciona la inflamación de los tejidos blandos peri-implantarios, produciendo edema, enrojecimiento, sobrecrecimiento gingival, sangrado al sondaje (BOP) y aumento de la PS y la POM (Schwarz et al., 2018) (**Figura 2**).

Los primeros signos clínicos de PI se asocian a una pérdida ósea marginal de 0,5 mm y pueden aparecer hasta en el 66% de los implantes a partir del segundo o tercer año tras su colocación (Derks et al., 2016). No obstante, el inicio de la enfermedad también puede producirse durante el primer año hasta en el 5% de los casos (Schwarz et al., 2017).

El aumento de la POM no es lineal y puede exacerbarse en cualquier momento durante el curso de la enfermedad (Albouy et al., 2008; Albouy et al., 2009); siendo el patrón de pérdida ósea crestal más común el circunferencial y uniforme (55%), con mantenimiento de las tablas óseas bucal y lingual, (Schwarz et al., 2007).



**Figura 2.** Caso de Peri-implantitis. Aspecto clínico de 6 implantes en el maxilar inferior con peri-implantitis, que muestran gran acúmulo de placa bacteriana y BOP.

La PS aumentada ( $\geq 6$  mm) aparece hasta en el 66% de los pacientes con PI, y es uno de los parámetros clínicos que se utilizan en el diagnóstico de esta enfermedad, acompañando en ocasiones de BOP (Derks et al., 2016). La presencia de sangrado no es un signo diagnóstico patognomónico de la PI, ya que también puede aparecer en casos de MPI o incluso en salud peri-implantaria (Derks et al., 2016). Sin embargo, el sangrado de la mucosa peri-implantaria es el principal indicador de la aparición y progresión de la enfermedad, así como su primer signo, por lo que su manejo es clave en la prevención primaria de la PI (Tonetti et al., 2015). La prevención secundaria de la PI está dirigida a los grupos de riesgo que, tras completar la fase activa de la terapia, han de seguir la terapia periodontal de apoyo (Tonetti et al., 2015).

Los principales factores de riesgo en relación con el desarrollo de la PI son: 1) un historial clínico previo de periodontitis, y 2) un mal control de placa y/o de la terapia de mantenimiento (Schwarz et al., 2018).

Los pacientes con antecedente de periodontitis presentan una PS  $\geq$  6 mm (6%-27%) y una POM  $\geq$  3 mm (11%-15%) mayor a la de los pacientes sin compromiso periodontal previo (PS: 2%; POM: 5%); así como una mayor tasa de conversión de MPI a PI (31%) (Roccuzzo et al., 2010; Roccuzzo et al., 2012). La presencia de periodontitis activa durante la terapia con implantes dentales supone un factor de riesgo entre 4 y 7 veces mayor para desarrollar PI (Máximo et al., 2008; Koldslund et al., 2010; Koldslund et al., 2011; Casado et al., 2013; Renvert et al., 2014; de Araujo Nobre et al., 2015; Daubert et al., 2015; Dalago et al., 2017).

La terapia de mantenimiento es fundamental en el manejo de la PI, no sólo para la monitorización de los pacientes, sino también para la prevención de este trastorno (Aguirre-Zorzano et al., 2015). El control del estado de los implantes dentales permite valorar el acúmulo de placa bacteriana, así como los cambios que se producen en el estado de la PS y la POM, y establecer una terapia temprana en caso de que se instaure el trastorno. Dado que el inicio de la PI puede desarrollarse a corto o a largo plazo, es fundamental realizar un control activo de los pacientes. Se ha señalado un riesgo hasta 14 veces mayor de padecer PI en los pacientes que no acuden a terapia de mantenimiento, con una incidencia de PI del 44%, frente al 18% en los pacientes que acuden a terapia de mantenimiento (Ferreira et al., 2006; Rokn et al., 2017).

El hábito tabáquico y la diabetes mellitus representan dos factores de riesgo cuya implicación en el desarrollo de la PI aún está sin evidenciar completamente (Schwarz et al., 2018). Aunque el consumo de tabaco es un claro promotor de POM, existen



discrepancias entre diferentes estudios (Lindquist et al., 1996; Rinke et al., 2011). Estas diferencias pueden deberse a múltiples razones, como la falta de unanimidad para reflejar correctamente el consumo de tabaco de los pacientes y/o la falta de análisis de otras covariables como el antecedente de periodontitis. Por otro lado, la mayoría de estudios (Taylor y Borgnakke 2008) que reconocen la asociación de la PI con la diabetes mellitus tipo II sólo recogen el dato verbal de los pacientes y muy pocos el nivel glucémico y de la HbA1c. Por todo ello, son necesarios más estudios homogenizados que analicen estas posibles relaciones (Tawil et al., 2008).

También se han tratado de relacionar otros trastornos sistémicos con la aparición de PI, entre los que destacamos la enfermedad cardiovascular y la artritis reumatoide, aunque la evidencia obtenida todavía es muy limitada (Renvert et al., 2014).

Una vía alternativa que trata de explicar la etiopatogenia de la PI está relacionada con los factores locales que rodean a los implantes dentales (Schwarz et al., 2018): la malposición del pilar de restauración, el sobrecontorneado de la restauración, la malposición del implante, el diseño protésico incorrecto, la sobrecarga oclusal, la presencia de partículas de titanio, de restos de cemento, etc. (Eriksson et al., 1984; Kozlovsky et al., 2007; Trisi et al., 2009; Lin et al., 2013; Trisi et al., 2014; Sridhar et al., 2016). Todos estos factores dificultan el acceso para realizar una correcta higiene bucodental, favoreciendo el acúmulo de placa bacteriana y la POM. De la misma manera, una excesiva sobrecarga oclusal y lateral podría aumentar el remodelado óseo inicial alrededor del implante (Kozlovsky et al., 2007; Heitz-Mayfield et al., 2004; Sridhar et al., 2016). La presencia de cemento favorece la inflamación de los tejidos peri-implantarios y la formación de biopelículas bacterianas (de Brandao et al., 2013; Schwarz et al., 2014; Canullo et al., 2016; Staubli et al., 2017).

Desgraciadamente, no todos los individuos que presentan los factores de riesgo señalados anteriormente acaban desarrollando una PI (Serino et al., 2009; Caton et al., 2018). Por ello, otro elemento favorecedor para la aparición de este trastorno sería la existencia de una susceptibilidad genética especial en algunos de estos pacientes, que facilitaría el desarrollo de la PI (Esposito et al., 1998; Eguia et al., 2018).

## 2.2. La susceptibilidad genética en la enfermedad peri-implantaria

La variación genética es la base de la diversidad humana (Wang et al., 1998). Los polimorfismos genéticos (PG) son variaciones individuales en un punto determinado de la secuencia del ADN, que aparecen en más del 1% de la población (Smith et al., 2005). Los polimorfismos de un único nucleótido (SNP) son los PG que ocurren con mayor frecuencia (Smith et al., 2005), y se distribuyen por todo el genoma humano, alcanzando un promedio aproximado de 1 SNP por cada 1000 pares de bases (Landegren et al., 1998). La detección de este tipo de mutación genética puede utilizarse para identificar los genes y las proteínas implicadas en una enfermedad específica (Landegren et al., 1998).

Dependiendo del tipo celular, las alteraciones genéticas pueden ocurrir en células de la línea germinal (hereditarias) o de la línea somática (no hereditarias), y pueden clasificarse en mutaciones por sustitución (cambio de una base por otra) y mutaciones por inserción o deleción (adición/ eliminación de uno o más pares de bases) (Karki, 2015).

La posible existencia de una susceptibilidad genética en el origen de la enfermedad periodontal ha sido ampliamente estudiada en el pasado (Michalowicz et al., 2009); y su análisis en el contexto de la PI también ha sido objeto de estudio por diferentes grupos de investigación (Dereka et al., 2010; Eguia et al., 2018).

Como cabía esperar, los genotipos que más se han estudiado en la PI corresponden a los de las interleuquinas (IL), sobre todo IL1 $\beta$  e IL1 $\alpha$ , activamente implicadas en el proceso infeccioso-inflamatorio peri-implantario (Rogers et al., 2002; Gruica et al., 2004; Jansson et al., 2005; Laine et al., 2006; de Boever y de Boever, 2008; Hamdy y Ebrahim, 2007; Lachmann et al., 2007; Jaworska-Zaremba et al., 2008; Montes et al., 2009; Dirschnabel et al., 2011; Melo et al., 2012; Vaz et al., 2012; García-Delaney et al., 2015; Cosyn et al., 2016; Fernandes et al., 2017); aunque también se han estudiado los SNPs de IL6 (Campos

et al., 2005; Melo et al., 2012; Rakic et al., 2017) e IL-10 (Gurol et al., 2011; Rakic et al., 2017; Ribeiro et al., 2017).

La respuesta inflamatoria constituye un fenómeno fisiológico y orgánico asociado a la supervivencia del ser humano, que consta de cuatro etapas en las que intervienen diferentes vías de señalización celular: 1) la inducción del estímulo, 2) la detección del estímulo, 3) la mediación celular y/o molecular, y 4) la reparación tisular (Mogensen, 2009). La activación de estas vías depende de la naturaleza del elemento que desencadena la respuesta inflamatoria. En el caso de los agentes patógenos bacterianos, estos son reconocidos por receptores del sistema inmunológico innato, como los receptores macrofágicos tipo-Toll (TLR), que a su vez sintetizan y secretan citoquinas inflamatorias (IL1, IL6, TNF) (Mogensen, 2009). Posteriormente, estos mediadores inducen vasodilatación, extravasación de polimorfonucleares, acumulación de plasma y quimiotaxis leucocitaria; conformando un magma inflamatorio encargado de destruir los patógenos invasores (Medzhitov, 2010). La respuesta inflamatoria concluye con la eliminación del agente desencadenante y la reinstauración de la homeostasis tisular, mediante la regulación de las quimiocinas, citoquinas y el inicio de la curación (Serhan y Savill, 2005).

La inflamación es la patogenia común de muchas enfermedades crónicas en el ser humano, como la diabetes mellitus, la artritis, ciertos cánceres, etc. (Libby, 2007). En el caso de la PI, los diferentes complejos estructurales denominados “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMP) inducen la puesta en marcha de un sistema intracelular de respuesta en cascada (Akira et al., 2001). Esta interacción molecular entre el estímulo (productos de desecho microbianos, IL1 $\beta$ , IL6 y TNF $\alpha$ ) y el receptor (TLR, IL1R, IL6R, TNFR) activa importantes vías de señalización intracelular, que regulan el proceso inflamatorio y mantienen la producción de citoquinas y el reclutamiento de células

inflamatorias (Hoffman et al., 2006). Una mala regulación de estas vías altera la respuesta inflamatoria.

Por ello, la presencia de SNPs en los genes que sintetizan estas proteínas podría producir una respuesta celular e inflamatoria anómala que disminuya la capacidad de osteointegración de los implantes dentales. Cada una de estas moléculas inflamatorias puede suponer una herramienta diagnóstica eficaz como biomarcador potencial en varias enfermedades (Lindahl et al., 2000; Shlipak et al., 2003; Goldstein et al., 2009; Miller et al., 2009; Gupta et al., 2012; Czaja, 2014), y también en la PI (Lachmann et al., 2007).

La IL1 actúa como mediador de la respuesta inflamatoria, y a su vez promueve la reabsorción ósea y la destrucción de la matriz extracelular mediante la activación de las metaloproteinasas de la matriz (MMP) (Graves y Cochran 2003). La IL1 es una IL de bajo peso molecular cuyas principales funciones biológicas forman parte de la inmunidad innata y que presenta tres formas diferentes: IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  y IL1RN (Dinarello, 2009). Los SNP de la IL1 $\beta$  más frecuentes y estudiados en relación con la PI se localizan en las posiciones 3953 [IL1 (+3953)] y 511 [IL1 (-511)] (Laine et al., 2006; García-Delaney et al., 2015), y el de IL1 $\alpha$  en la posición 889 [IL1 $\alpha$  (-889)]. Hasta la fecha, ningún estudio ha demostrado la existencia de una relación entre el SNP IL1 $\beta$  (+3953) o IL1 $\alpha$  (-889) y la presencia de PI. No obstante, la metodología de estos trabajos ha sido heterogénea, probablemente debido a las diferencias en la evaluación diagnóstica; y porque no siempre se han valorado algunos parámetros importantes, como el antecedente previo de periodontitis o el consumo de tabaco.

Únicamente los estudios realizados en Japón (Shimpuku et al., 2003; Lin et al., 2007), han observado una relación directa entre la presencia de la IL1 $\beta$  (-511) y la POM. Otros trabajos realizados en Suecia y Egipto han encontrado una asociación estadísticamente

significativa entre el genotipo compuesto por IL1 $\beta$  (+3945) e IL1 $\alpha$  (-889), y la presencia de PI (Laine et al., 2006; Hamdy et al., 2011). Un meta-análisis reciente (Lafuente-Ibáñez de Mendoza et al., 2022; **Apéndice 1**) señala que no existe ningún vínculo entre la existencia de PI y la presencia de los SNP IL1 $\beta$  (+3953) e IL1 $\alpha$  (-889); sin embargo, si existiría una asociación de riesgo entre la presencia del genotipo C/C de la IL1 $\beta$  (-511) y la PI.

La proteína IL10 es otra potente citoquina anti-inflamatoria, que reduce la síntesis de las moléculas inflamatorias (IL1, TNF $\alpha$ ) y de la matriz extracelular (gelatinasa, colagenasa); al tiempo que potencia la diferenciación de los osteoblastos e inhibe la formación de los osteoclastos (Zhang et al., 2014). Hasta ahora, el SNP IL10 (-1081) sólo se ha asociado a la PI en pacientes alemanes fumadores o que presentaban antecedentes de periodontitis (Petkovic-Curcin et al., 2017). Otra citoquina importante es la IL6, cuya acción proinflamatoria induce la expresión del RANKL durante el proceso reabsortivo (Yoshitake et al., 2008). No obstante, todavía no se ha demostrado que su SNP esté asociado al desarrollo de la PI (Melo et al., 2006; Ladeira-Casado et al., 2013; Petkovic-Curcin et al., 2017).

El metabolismo óseo es un complejo proceso biológico dinámico que se inicia en el ser humano en la sexta semana de vida intrauterina con la formación de los primeros huesos, y en la que participan cuatro grandes grupos celulares: los osteoblastos, los osteocitos, las células del revestimiento óseo y los osteoclastos (Davies, 2003). La interacción de estos elementos mantiene el equilibrio fisiológico entre la aposición y la reabsorción ósea (Florencio-Silva, 2015).

La osteointegración peri-implantaria es un fenómeno fisiológico en el que diferentes elementos tisulares del hospedador permiten la correcta unión del biomaterial (Titanio)

con el hueso maxilar nativo (Brånemark, 1985). Este proceso depende preferentemente de la estabilidad primaria (mecánica) que se consiga durante el acto quirúrgico durante la colocación del implante dental, y del tipo de tejido óseo donde se coloque.

El tejido óseo puede diferenciarse en dos grandes grupos: el hueso cortical (hueso clase I) y el hueso esponjoso (hueso clase IV) (Clarke, 2008). La morfología y arquitectura del hueso marginal es un elemento clave en el éxito de la osteointegración implantaria (Insua et al., 2017). El hueso cortical proporciona una mayor estabilidad inicial; mientras que el hueso esponjoso, que presenta un mayor número de estructuras vasculares, se encarga de la diferenciación celular para la futura integración de la interfase hueso-implante (Davies, 2003). Esto es debido a que la regeneración del hueso cortical peri-implantario se realiza, exclusivamente, de manera laminar (directa) a partir de osteoblastos situados sobre el hueso ya existente; mientras que la regeneración del hueso trabecular implica, no sólo la remodelación de las trabéculas existentes (osteogénesis a distancia), sino también la rápida formación de hueso a partir de nuevas poblaciones celulares osteogénicas medulares situadas sobre el implante (osteogénesis de contacto) (Osborn y Newesely, 1980; Davies, 2003).

La cirugía con implantes dentales pone en marcha un conjunto de señales celulares y moleculares que conducen a la apoptosis de los osteoclastos, la secreción de moléculas tipo RANKL que promueven la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea, y la degradación de las fibras colagénicas de la matriz extracelular existente (células de revestimiento óseo) (Insua et al., 2017).

Se ha demostrado que durante el proceso de degranulación plaquetaria que se produce en la cirugía implantaria, también se secretan un gran número de moléculas quimiotácticas para las células osteogénicas de la médula ósea, entre las que destacan el factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento transformante beta (TGF $\beta$ ) (Gonçalves et al., 2016), que también inducen la angiogénesis y el mantenimiento de la respuesta osteogénica (Graves et al., 1989). El asentamiento de la membrana de fibrina, y su permeabilidad sobre la superficie peri-implantaria, proporciona la base para el anclaje de las primeras células osteogénicas, funcionando como una vía para la llegada de nuevas células a través del torrente sanguíneo (Borie et al., 2015).

Las proteínas implicadas en el remodelado óseo, cuyos SNPs han sido estudiados en relación con la existencia de PI son la BMP4, BRINP3, CD14, FGF3, FGF10, LTF, OPG, y RANKL (Santos et al., 2004; Casado et al., 2015; Rakic et al., 2015; Coelho et al., 2016; Zhou et al., 2016; Ribeiro et al., 2017).

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF) son factores de crecimiento situados en las células osteoprogenitoras y fibroblásticas que se encargan de regular la diferenciación osteoblástica durante el remodelado óseo (Anderson et al., 2000). Se ha observado que ciertos SNPs de BMP4, FGF3 y FGF10 podrían estar relacionados con la PI, inicialmente en pacientes brasileños (Casado et al., 2015; Coelho et al., 2016).

La lactoferrina (LTF) es un tipo de glicoproteína transferrina presente en las secreciones epiteliales y en los gránulos neutrofilicos, que estimula la proliferación y la diferenciación osteoblástica (Naot et al., 2005). Sólo un grupo de investigación de Brasil (Doetzer et al., 2015) ha estudiado los SNPs de la LTF en relación con la PI, sin reconocer una asociación positiva.

La diferenciación osteoclástica es un proceso mediado por el *cluster* de diferenciación 14 (CD14) en los monocitos, que termina su actividad cuando el ligando del receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) de los osteoclastos ya maduros, inicia la



osteoclastogénesis (Massey y Flanagan, 1999; Sørensen et al., 2007). Se ha sugerido una posible relación de la PI con el polimorfismo CD14 (-159) (Rakic et al., 2015; Petkovic-Curcin et al., 2017), pero no con el RANKL (-438) (Kadkhodazadeh et al., 2013; Ribeiro et al., 2017; Reis et al., 2020); por lo que los osteoclastos que participan en la osteointegración de los implantes podrían estar alterados desde los estadios iniciales de su diferenciación.

La osteoprotegerina (OPG) es otra molécula que se expresa en la superficie de los osteoblastos, que actúa como receptor antagonista del RANK, evitando la reabsorción ósea (Wright et al., 2009). Se ha sugerido que genotipos específicos como el de la OPG(1181C) también podrían estar asociados a la aparición de la PI (Kadkhodazadeh et al., 2012; Zhou et al., 2016).

Aun siendo una vía de estudio muy sugestiva, todavía no se ha demostrado la verdadera implicación de la susceptibilidad genética y la existencia de SNPs específicos en relación con el desarrollo de la PI. Estos pobres resultados probablemente se deban tanto a la heterogeneidad poblacional como a la de los criterios diagnósticos utilizados para el diagnóstico de la PI. Por ello, consideramos que son precisos más estudios sobre muestras amplias bien seleccionadas, con un diseño metodológico actualizado y específico, analizando múltiples SNPs y en diferentes poblaciones. En este sentido, sólo existe un trabajo de investigación sobre polimorfismos de la IL1 en población española (García-Delaney et al., 2007), lo que hace muy interesante el realizar más estudios.

### 2.3. La citología exfoliativa y la enfermedad peri-implantaria

El diagnóstico actual para la PI es clínico-radiológico y se basa en la valoración de los diferentes datos semiológicos previamente mencionados, como la PS, POM, BOP y la presencia de supuración (Zitzmann y Berglundh 2008, Lindhe y Meyle 2008, Lang y Berglundh, 2011; Schwartz et al., 2018). En ocasiones, estos datos diagnósticos pueden ser difíciles de obtener e interpretar, motivando confusión e impidiendo establecer un diagnóstico correcto precoz y establecer un tratamiento y seguimiento apropiados de la enfermedad (Albrektsson et al., 2016). Además, estos parámetros diagnósticos pueden mostrar una gran variabilidad y subjetividad en su valoración, lo que dificulta la diferenciación entre salud y enfermedad peri-implantaria (Lachmann et al., 2013, Albrektsson et al., 2016). Las discrepancias existentes en relación con los diferentes criterios diagnósticos y con las definiciones de PI hacen que las cifras de su verdadera prevalencia sean, a menudo, muy variables y cuestionables (Zitzmann y Berglundh, 2008; Lang y Berglundh, 2011; Rosen et al., 2013, Albrektsson et al., 2016; Tarnow, 2016).

El estudio histopatológico de las lesiones sigue siendo la prueba diagnóstica *gold standard* para categorizar los trastornos inflamatorios y no inflamatorios de la mucosa peri-implantaria (Sotorra et al., 2020). Las lesiones inflamatorias reactivas hiperplásicas que se producen en la PI muestran una proliferación de epitelio escamoso y de tejido conectivo fibrocelular granulomatoso, asociado a un intenso infiltrado inflamatorio, preferentemente crónico, con linfocitos y células plasmáticas, pero también agudo, con polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos (Sanz et al., 1991; Berglundh et al., 2004; Sotorra et al., 2020).

Dado que los cambios morfológicos en los tejidos peri-implantarios pueden observarse a nivel celular, es importante desarrollar procedimientos que nos faciliten su diagnóstico

desde los estadios iniciales de la PI; y que además sean fáciles, incruentos y útiles (Hayama et al., 2005, Patton et al., 2008). La citología exfoliativa es una metodología histopatológica sencilla basada en la evaluación microscópica de las células que se desprenden de los tejidos de modo natural por exfoliación y/o por raspado, tras realizar su fijación y tinción (Acha et al., 2005).

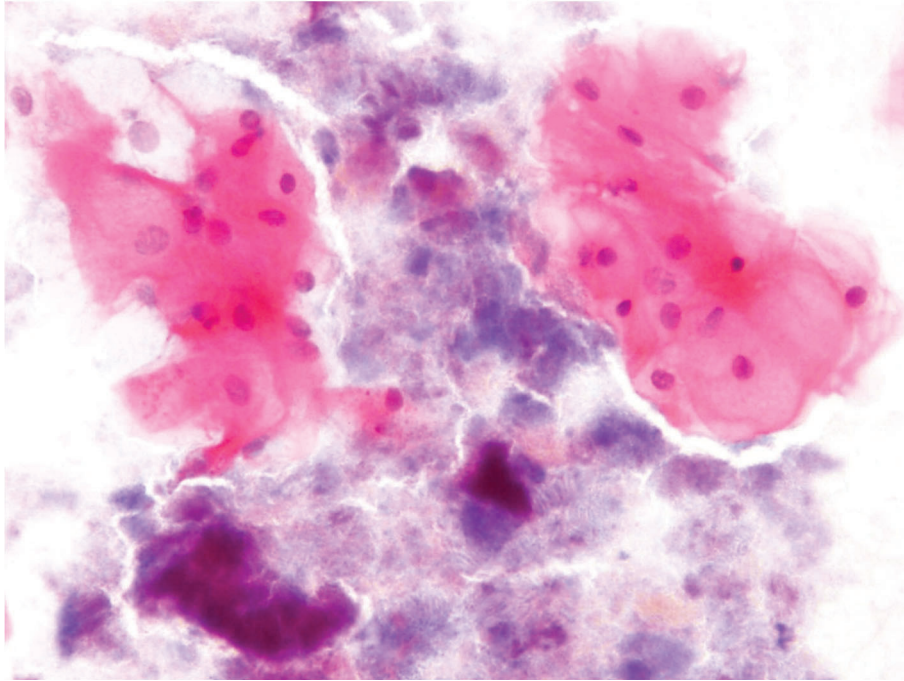
La primera aplicación diagnóstica reconocida de la citología exfoliativa por raspado la realizó Julius Vogel en 1843, al observar células carcinomatosas en muestras obtenidas de un cáncer mama. Posteriormente, George Nicholas Papanicolaou (1925), padre de la citología moderna, la situó en la cima como técnica diagnóstica y pronóstica fundamental en el diagnóstico del carcinoma del cérvix uterino (Saumann, 1994). Papanicolaou estableció una sistemática para la toma de la muestra, la fijación y la tinción. Diseñó una nomenclatura para los diferentes tipos de alteración citológica relacionadas con el cáncer cervicouterino (Pap Test), que ha servido como base para la estandarización de la citología clínica moderna preventiva (Marchetti, 1969).

La mucosa oral presenta un epitelio escamoso poliestratificado plano que muestra diferentes grados de queratinización. La encía y la mucosa peri-implantaria presentan un epitelio escamoso con crestas epiteliales alargadas y con fina ortoqueratinización superficial. Al aplicar la técnica citológica de Papanicolaou podemos visualizar y diferenciar los queratinocitos según su posición en los diferentes estratos del epitelio (Rusu et al., 1973). Así, las células basales aparecen azul-verdosas, con una ratio núcleo-citoplasma de 1:2 y con un núcleo redondeado de cromatina dispersa; las células parabasales son esférico-cuboidales azuladas y con la cromatina nuclear bien definida; las células intermedias son poligonales y menos azuladas, con un núcleo más pequeño; las células superficiales son rosadas eosinofílicas, con el núcleo picnótico pequeño; y las células superficiales cornificadas son eosinofílicas y están anucleadas.

Stahl (1967) fue el primero en describir y demostrar que las alteraciones morfológicas de los queratinocitos gingivales en los procesos inflamatorios de la encía podían ser visualizados mediante citología exfoliativa (Lange, 1965). No obstante, existe poca información científica que relacione la citología exfoliativa oral con la enfermedad periodontal convencional, y menos aún con los trastornos peri-implantarios (Tetsch y Schone, 1976; Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014; Tesis Doctoral Javier Vallejo, 2017).

En una encía clínicamente “sana” los extendidos citológicos aparecen limpios, con células escamosas eosinófilas y no se observan leucocitos (Carraro et al., 1965, De Boever et al., 2006, Fürst et al., 2007, Albertini et al., 2015). En cambio, en condiciones de inflamación tisular gingival, la mucosa empieza a sufrir alteraciones con vacuolización y necrosis celular; observándose un aumento de neutrófilos, leucocitos y eritrocitos, y alteraciones morfológicas de los queratinocitos (agrandamiento nuclear, cromatina irregular, núcleo picnótico, etc.) (Saki et al., 1960) (**Figura 3**).

En los trastornos peri-implantarios, se ha reconocido que al inicio de la MPI existe una mayor presencia de cocos, bacilos y espiroquetas en la mucosa peri-implantaria (Pontoriero et al., 1995). La cantidad de esta microbiota se asocia, de manera significativa, con el desarrollo de la MPI desde los 4 meses tras la carga de los implantes dentales, por lo que su observación citológica nos podría ayudar a identificar a pacientes con mayor riesgo para desarrollar PI (Costa et al., 2012).



**Figura 3.** Extendido citológico por raspado de la mucosa peri-implantaria con células escamosas de diferentes estratos de la mucosa (rosa-naranja) y colonización bacteriana (morado-azul) (Papanicolaou 20x).

Además, el sangrado de la mucosa peri-implantaria es un dato clínico crucial en la progresión de la PI (Tonetti et al., 2015). Por ello, su reconocimiento también podría ser crucial en la prevención primaria de la PI; al igual que la identificación de células inflamatorias. Se ha señalado que los extendidos citológicos de la mucosa peri-implantaria con PI podrían mostrar un mayor componente de neutrófilos y linfocitos (Olmedo et al., 2013; Belibasakis, 2014; Lucchese et al., 2014). Sin embargo, no existe ningún estudio que realice una caracterización clínico-citológica de la mucosa peri-implantaria de implantes en salud peri-implantaria vs implantes con PI.

A la vista de estos antecedentes, consideramos que el estudio citológico por raspado de la mucosa peri-implantaria nos puede permitir establecer un perfil citológico específico de salud y enfermedad peri-implantaria, que nos ayude a realizar un diagnóstico precoz y a mejorar el control de la enfermedad peri-implantaria.

#### 2.4. *Candida spp.* y la enfermedad peri-implantaria

La repercusión de las enfermedades infecciosas en la Salud pública ha sido motivo de estudio desde hace mucho tiempo (Smith et al., 2012). Los principales trastornos infecciosos orales, y en concreto los de los tejidos periodontales, no generan por lo general la misma gravedad que las patologías infecciosas sistémicas, pero pueden tener importantes repercusiones.

Las primeras referencias sobre la infección oral por hongos del género *Candida spp.* comienzan en la antigua Grecia, cuando Hipócrates describió por primera vez la candidiasis oral como “*bocas afectadas por aftas*” en su cuarto tratado “*De las epidemias*” del *Corpus hippocraticum* (475 y 466 aC). Fredrik Berg fue el primero en constatar que la candidiasis era una infección micótica y que la presencia del hongo era necesaria para su diagnóstico (Knoke y Bernhardt, 2006). Posteriormente, el micólogo francés Charles Phillipe Robin clasificó a este patógeno como *oidium albicans* (albicans=blanquear). La taxonomía definitiva de *Candida albicans* la describió en su tesis la botánica Christine Marie Berkhout en 1923, partiendo de la denominación latina de *toga candida* (túnica blanca usada por los senadores romanos) (Holland y Vinh, 2009).

Las micosis por *Candida* pueden ser superficiales (oral, vaginal, cutánea, mucocutánea) o profundas (miocarditis, septicemia, ocular, pulmonar, etc.) (Molero et al., 1998).

Los hongos del género *Candida spp.* incluyen más de 100 especies fúngicas, de las cuales la mayoría vive en endosimbiosis en el ser humano (Ciurea et al., 2020). Las infecciones causadas por *Candida spp.* afectan sobre todo a pacientes inmunosuprimidos, considerándose “la enfermedad del paciente enfermo”. Alrededor del 80% de los casos corresponden a una infección por *C. albicans*; aunque las infecciones por otras especies

(*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*) son cada vez son más frecuentes (Aguirre, 2002; Mark y Roberts, 2016).

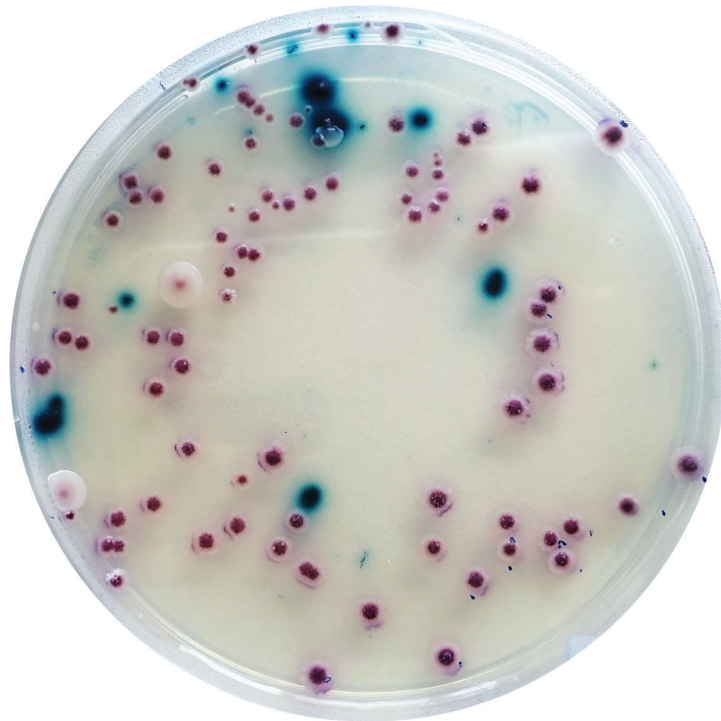
La transformación de colonización oral por *Candida spp.* en infección y el desarrollo de una candidiasis depende de factores relacionados con el patógeno y con el hospedador (Aguirre, 2002). El patógeno trata de evadir la defensa inmunológica del hospedador y sobrevivir, siendo los principales factores de virulencia de *Candida spp.* su capacidad de adherencia, cambio morfológico, formación de biopelículas, secreción de enzimas hidrolíticas y su adaptabilidad metabólica (Ciurea et al., 2020). Al mismo tiempo, la inmunidad innata del hospedador (neutrófilos y macrófagos) reconoce los elementos moleculares específicos de *Candida spp.* (carbohidratos, ácidos nucleicos, polisacáridos, etc.) y los PAMP, poniendo en marcha la liberación de diferentes citoquinas proinflamatorias y quimiocinas, que modulan la respuesta inmunológica (Lionakis y Netea, 2013).

La adherencia de *Candida spp.* a las células de la mucosa oral del hospedador se realiza por proteínas localizadas en la superficie de la célula fúngica, para luego invadirlas mediante endocitosis inducida y penetración activa (Hoyer y Cota, 2016). Las cepas altamente patógenas también expresan genes asociados con el crecimiento filamentoso y la formación de biopelículas (Hoyer y Cota, 2016) (**Figura 4**).

Los cambios en el pH ambiental, las concentraciones de oxígeno, el dióxido de carbono, y/o la concentración de glucosa también causan la filamentación de *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* y *C. tropicalis* (Haynes, 2001). Las hifas secretan una serie de toxinas peptídicas, entre ellas la candidalísina, que dañan el epitelio y activan la respuesta inmunológica innata, a través del factor de crecimiento epidérmico y el reclutamiento de células inflamatorias (Moyes et al., 2016).



*Candida spp.* también posee la capacidad de segregar una serie de enzimas hidrolíticas: proteinasas (Saps), fosfolipasas (PL) y lipasas (Lip), que debilitan la membrana de la célula diana, induciendo su lisis y atacando al sistema inmunológico del hospedador (Schaller et al., 2005). De forma específica, *C. albicans* secreta proteasas aspárticas (SAPP1-SAPP1a y SAPP1b, SAPP2 y SAPP3) que modulan la actividad macrófaga e interrumpen la cascada del complemento en la respuesta inflamatoria (Singh et al., 2019).



**Figura 4.** Placa de Candida Chromogenic Agar/ CONDA (CondaLab®). UFCs de *C. albicans* (verde), *C. krusei* (blanco-rosa) y *C. glabrata* (violeta).

La especie *C. albicans* crece formando unidades microbianas complejas con células levaduriformes denominadas biopelículas, cuyo objetivo es aumentar sus posibilidades de supervivencia (Finkel y Mitchell 2011; Ciurea et al., 2020). Después, esta comunidad pluricelular comienza a producir una matriz extracelular tridimensional (glucosa y manosa) que mezcla diferentes especies fúngicas y bacterianas, formando "biopelículas



mixtas" más agresivas y complejas (Chandra et al., 2001; Silva et al., 2011; Fanning y Mitchell, 2012; Schlecht et al., 2015). De esta manera, la unión entre las hifas de *C. albicans* y *C. glabrata* facilita la proliferación de *C. glabrata*, y la colonización de *S. aureus* crece a expensas de las hifas de *C. albicans*. No obstante, *S. aureus* reprime la proliferación de *C. glabrata*, y *C. tropicalis* afecta a la formación de biopelículas de *C. albicans* (Tati et al., 2016). Se sabe que, en la cavidad oral, las colonias mixtas de *C. albicans* y otras especies no-albicans como *C. krusei* o *C. glabrata* son más leves que las simples (Rossoni et al., 2015).

La capacidad de los microorganismos para formar biopelículas está influenciada por factores intrínsecos (expresión de genes que codifican proteínas de adhesión, sistemas de señalización, etc.) y factores externos (composición del sustrato, temperatura, bacterias antagonistas o sinérgicas, etc.) (Wimpenny et al., 2000; Mba et al., 2020). La estructuración de las biopelículas varía de una especie a otra. Así, el biofilm de *C. albicans* se organiza en dos capas: una basal de blastosporas, cubierta por otra con hifas y una matriz gruesa; el de *C. tropicalis* es una monocapa compacta filamentosa; el de *C. parapsilosis* es una monocapa o multicapa discontinua con blastosporas, levaduras y pseudohifas; y el de *C. glabrata* es una monocapa o multicapa compacta con sólo blastosporas (Silva et al., 2011). La composición de la matriz también es distinta, siendo la de *C. tropicalis* baja en proteínas y carbohidratos, la de *C. parapsilosis* baja en proteínas y alta en carbohidratos, y la de *C. glabrata* alta en proteínas y baja en carbohidratos (Araújo et al., 2017).

Las superficies inorgánicas, como la de los implantes dentales, constituyen un anclaje y un nicho perfectos para la formación de biofilms de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* (Sherry et al., 2017). Frente a ello, las proteínas defensoras tipo IgA,

lisozima, mucina y lactoferrina tratan de bloquear su adhesión y multiplicación sobre el implante (Pereira-Cenci et al., 2008; Lauren Bach y Epstein, 2009).

Para causar infección, las levaduras se desprenden de la biopelícula, y se diseminan a otros nichos mediante fuentes de carbono y cambios en el pH (Uppuluri et al., 2010). La vida útil de las hifas y de las levaduras es similar, pero disminuye a medida que envejecen (acumulación de glucógeno, ruptura del ADN, etc.) (Fu et al., 2008; Potocki et al., 2019). Por ellos, en situaciones de estrés, las células de *Candida spp.* entran en apoptosis, liberando sustancias que ayudan a los clones más jóvenes a sobrevivir y mejorar la virulencia de la población micótica (Herker et al., 2004; Phillips et al., 2006; Lin y Austriaco, 2014).

Aunque el perfil microbiológico de la enfermedad peri-implantaria es principalmente bacteriano, en la aparición y desarrollo de la PI también pueden estar implicados otros agentes microbianos, incluidos los fúngicos, como *Candida spp.* La reconocida colonización y formación de biopelículas de este patógeno sobre otras superficies metálicas (prótesis de rodilla o cadera) es un dato patológico relativamente frecuente (Cobo et al., 2017). El surco peri-implantario es un nicho ecológico favorable para el crecimiento de *Candida spp.* No obstante, los estudios realizados hasta ahora han sido escasos y los resultados parciales, ya que no han analizado algunos factores importantes, como el número de UFC, la presencia de colonias mixtas, la relación de la colonización de *Candida spp.* con los diferentes parámetros clínicos, etc.

Conocemos que *Candida spp.* es un hongo comensal que está presente en la cavidad oral en más del 60% de los individuos sanos, y que en ocasiones desencadena cuadros de infección mucosa (Aguirre, 2002). Se sabe que el surco subgingival también puede servir de refugio para las especies fúngicas (Alrabiah et al., 2019), y que además ayuda a

mantener la inflamación periodontal (Urzúa et al., 2008; de la Torre et al., 2018). Dada la capacidad que posee este agente para adherirse a la zona de los implantes que se encuentra en íntimo contacto con el hueso maxilar, se ha postulado la hipótesis de que los hongos como *Candida spp.*, también podrían participar en la aparición y progresión de las enfermedades peri-implantarias (Alrabiah et al., 2019).

Una revisión sistemática reciente (Lafuente-Ibáñez de Mendoza et al., 2021; **Apéndice 2**) ha observado que la existencia de *Candida spp.* en el fluido peri-implantario es independiente del diagnóstico clínico; ya que tanto los pacientes en salud como los que padecen PI presentan *Candida spp.* (Kilic et al., 2014; Peñarrocha-Oltra et al., 2015; Gomes et al., 2017; Mencio et al., 2017; Alsahhaf et al., 2019; Ju et al., 2019). Varios autores afirman que su presencia es mayor en los implantes enfermos (3-76%) que en los sanos (9-50%); aunque sin diferencias estadísticamente significativas (Rosenberg et al., 1991; Leonhardt et al., 1999; Albertini et al., 2015; Canullo et al., 2015; Schwarz et al., 2015; Bertone et al., 2016; Mencio et al., 2017).

Las especies aisladas en muestras de fluido peri-implantario corresponden a *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *Candida lusitaniae*, *C. glabrata*, *Candida kefyr* y *Candida norvegensis* (Kilic et al., 2014; Canullo et al., 2015; Gomes et al., 2017). Se ha demostrado que los pacientes dentados presentan mayores cifras fúngicas que los edéntulos (Leonhardt et al., 1999; Canullo et al., 2015), así como los pacientes con sobredentaduras retenidas por barra (Alsahhaf et al., 2019); por lo que las superficies dentales y metálicas podrían ser factores importantes para su entrada y colonización peri-implantaria.

Aunque se desconoce el papel exacto de *Candida spp.* en el inicio de la enfermedad peri-implantaria, se considera que este agente microbiano podría estar implicado en fases más

avanzadas, cuando el microambiente bacteriano ya está establecido (Cavalcanti et al., 2016). Gomes et al., (2017) describieron que la cantidad de *Candida* tras la colocación del implante, era mayor a los 8 meses que a los 4.

Los hongos del género *Candida* también han sido aislados junto a otros microorganismos en muestras de fluido peri-implantario: *C. albicans* + *V. parvula*, *C. albicans* + *T. forsythia*, *C. albicans* + *M. salivarum*, *C. albicans* + *P. gingivalis* y *C. albicans* + *P. micra*; y *C. dubliniensis* + *M. salivarum*, *C. dubliniensis* + *V. parvula*, *C. dubliniensis* + *S. aureus*, *C. dubliniensis* + *P. micra* y *C. dubliniensis* + *T. forsythia* (Canullo et al., 2015).

Tras la colonización peri-implantaria, los conocimientos sobre la implicación de *Candida* en la pérdida ósea pueden ser difícil de explicar. Sin embargo, conocemos que la anaerobiosis de la bolsa peri-implantaria promueve la virulencia de *Candida*, aumentando la actividad de las Sap, a la vez que modula la respuesta inmune, manteniendo el estímulo inflamatorio y atrayendo otros peri-implantopatógenos (Rosa et al., 2008; Naglik et al., 2003; Sardi et al., 2008; Thein et al., 2007).

El único trabajo realizado en población española sobre la presencia de *Candida spp.* en muestras de fluido peri-implantario es el de Canullo *et al.*, (2015), donde se demuestra la existencia del hongo mediante qPCR en el 13,5% de las muestras de fluido peri-implantario. Hasta la fecha, no obstante, no se ha llevado a cabo una caracterización clínico-microbiológica de este patógeno, comparando implantes con PI y sin PI, teniendo en cuantos otros datos importantes como el tipo de prótesis, la PS y la POM de los implantes, la localización, o los antecedentes médicos de los pacientes. Además, tampoco se ha analizado la cantidad del crecimiento fúngico mediante el estudio de UFC.

Con estos antecedentes, consideramos que es necesario diseñar un análisis más pormenorizado sobre la relación de los hongos del género *Candida spp.* con la presencia de enfermedad peri-implantaria, y tratar de conocer su verdadera implicación.



### **3. MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1. Pacientes**

Hemos realizado un estudio observacional retrospectivo de casos y controles sobre 161 pacientes que acuden a la Unidad de Periodoncia y Osteointegración del Servicio Clínica Odontológica de la Universidad del País Vasco (UPV/EHU) y al Centro Odontológico Médico Quirúrgico (COMQ), para recibir control y terapia de mantenimiento de implantes dentales.

Este Proyecto sigue los principios de la Declaración de Helsinki sobre Principios Éticos para la Investigación Médica que involucra a sujetos humanos, y ha sido aprobado por la Comisión de Ética para la Investigación de la UPV/EHU (CEISH: M10/2016/057, CEIAB/2016/180). Todos los participantes firmaron un consentimiento informado antes de participar en el estudio. Los datos de carácter personal y las muestras recogidas en el estudio se han guardado, anónimamente, con un código asignado a cada caso, en el ordenador de la persona responsable del fichero (Dra. Ana María García de la Fuente), con clave de acceso y copia de seguridad en un disco duro.

Para el cálculo del tamaño muestral, se ha utilizado la aproximación de POISSON. Aceptando un riesgo alfa de 0,05 y un riesgo beta de 0,2 en un contraste bilateral, se precisan 78 casos y 78 controles para detectar una *odds ratio* mínima de 3. Se asume que la tasa de expuestos en el grupo control es del 0,5, estimando una tasa de pérdidas de seguimiento del 15%.

##### **3.1.1. Criterios de inclusión y exclusión**

Los criterios de inclusión para los participantes del estudio fueron: 1) Tener más de 18 años y 2) Tener al menos un implante dental en función durante un tiempo mínimo de 1

año. Los criterios de exclusión fueron: 1) No haber recibido antibióticos o fármacos relacionados con el metabolismo óseo y/o la cicatrización de los tejidos periodontales durante los últimos 6 meses previos a la colocación de los implantes y 2) Estar embarazada o en periodo de lactancia.

Los participantes incluidos en el Grupo Caso (GCA) fueron pacientes rehabilitados con implantes dentales y diagnosticados previamente de PI, en al menos un implante dental; y los participantes incluidos en el Grupo Control (GCO) fueron pacientes rehabilitados con implantes dentales, que no presentaban ningún implante dental diagnosticado de PI (**Figuras 5-6**). Todos los pacientes estaban sometidos a control y terapia de mantenimiento con instrucciones de higiene oral, que incluía una terapia antiséptica con clorhexidina en colutorio o gel (Lang et al., 2000).

Para el diagnóstico de PI hemos seguido los criterios diagnósticos consensuados por la Academia Americana de Periodoncia y de la Asociación Europea de Periodoncia (Caton et al., 2018):

- Presencia de sangrado y/o supuración tras realizar un sondaje cuidadoso.
- Incremento de la PS en comparación con exploraciones anteriores.
- Incremento de la POM más allá de la remodelación ósea inicial.

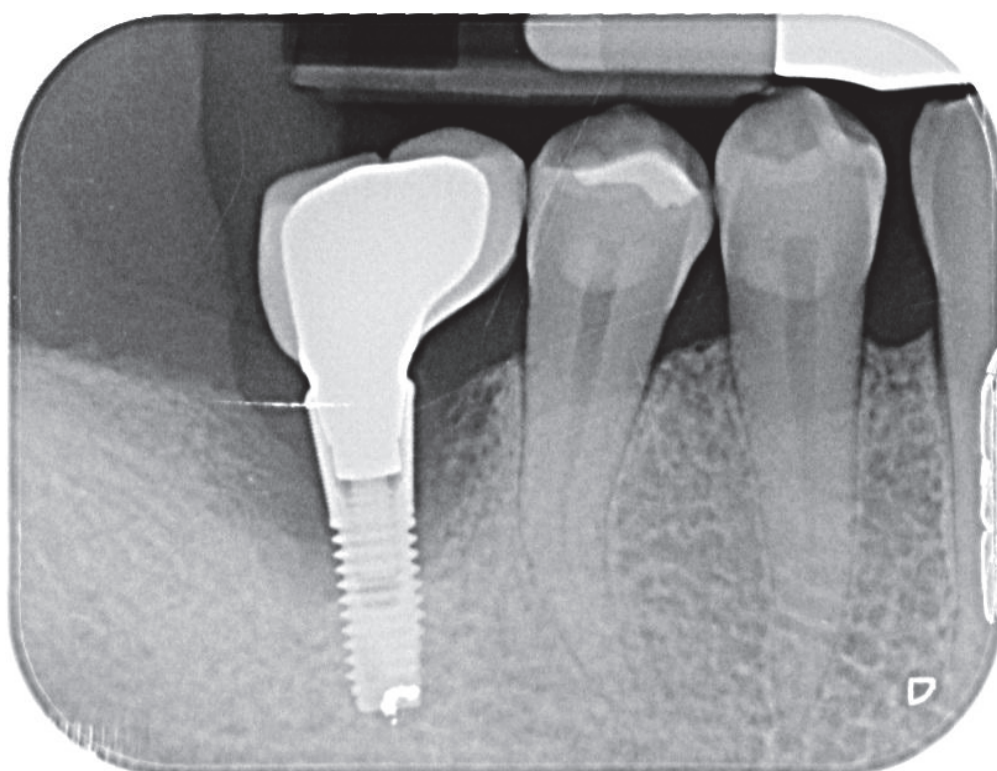
En caso de no existir registros clínicos anteriores, se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- Presencia de sangrado y/o supuración tras un sondaje delicado.
- PS peri-implantaria  $\geq 6$  mm.
- POM  $\geq 3$  mm del componente intraóseo del implante.





**Figura 5.** Aspecto clínico de un implante dental con peri-implantitis (posición 4.6).



**Figura 6.** Aspecto radiográfico de un implante con peri-implantitis (posición 4.6).

### 3.1.2. Protocolo clinicopatológico

La recogida de datos clinicopatológicos se realizó en la Unidad de Periodoncia y Osteointegración del Servicio Clínica Odontológica de la UPV/ EHU y el COMQ.

Tras el proceso de reclutamiento y la firma del consentimiento informado, en todos los casos y controles se cumplimentó un Protocolo clinicopatológico diseñado específicamente, que incluía:

- Datos generales:
  - Edad, género, tiempo de seguimiento desde la colocación del primer implante.
  - Antecedentes médicos: presencia de enfermedades sistémicas, consumo de alcohol, consumo de tabaco. Para la valoración del hábito tabáquico, los pacientes fumadores se clasificaron en consumidores de  $\geq$  de 10 cigarrillos al día o  $<$  10 cigarrillos al día. Se consideraron “exfumadores” los pacientes que habían abandonado el consumo tabáquico hasta 10 años antes de participar en el estudio.
- Datos orales:
  - Antecedente de padecer periodontitis
  - Presencia de edentulismo
  - Implantes: número y posición, fecha de colocación, tiempo hasta la aparición de PI. Todos los implantes dentales analizados eran de titanio, roscados y de superficie rugosa. Los implantes colocados en la UPV/EHU eran Straumann®, (Basilea, Suiza), AstraTech® (Molndal, Suecia), Ticare Mozo Grau® (Valladolid, España) y BTI® (Vitoria, España); y los colocados en el COMQ Nobel Biocare® (Kloten, Suiza), Straumann® (Basilea, Suiza) y AstraTech® (Molndal, Suecia).

- Datos peri-implantarios: PS, POM, BOP, supuración al sondaje.
- Datos radiográficos: Valoración de la POM mediante radiografías intraorales periapicales y/o extraorales panorámicas en el momento de la colocación del implante y durante los controles.

### 3.2. Recogida de las muestras

La recogida de las muestras se realizó en la Unidad de Periodoncia y Osteointegración del Servicio Clínica Odontológica de la UPV/EHU y el COMQ.

#### 3.2.1. Muestra para el análisis genético

##### 3.2.1.1. Toma de la muestra genética

Para el estudio de los polimorfismos genéticos se tomaron 2 muestras orales (**Figura 7**).

- Muestra citológica por raspado de la mucosa yugal y del dorso lingual, que se realizó durante un minuto con un cepillo citológico de nylon Rovers® Orcellex® (Lekstraat, Países Bajos). El cepillo se introdujo en 2,5 mL de agua milli-Q estéril en un tubo *ependorf* de 5 mL y se almacenó a una temperatura de -20°C.
- Muestra citológica por un enjuague oral, que se realizó durante 1 minuto con 25 mL de una dilución acuosa de clorhexidina al 0,12%. El contenido se recogió en un tubo Falcon de 50 mL estéril que se almacenó a una temperatura de -20°C.



**Figura 7.** Recogida de muestras. Kit para la extracción del material genético: tubo Falcon con 50 mL de clorhexidina al 0,12%, tubo *ependorf* con 2,5mL de agua milli-Q y cepillo para el raspado citológico.

### 3.2.1.2. Análisis de la muestra genética

- *Extracción del ADN*

La extracción de ADN se ha realizado en el Laboratorio de Genética de Medicina y Patología Oral del Departamento de Estomatología II, mediante el kit estándar Qiagen® (Hilden, Alemania).

La descongelación de las muestras se realizó en un baño de 37°C con agitación para resuspender las células. En la muestra del enjuague, se tomaron 5mL para la extracción de ADN y el resto se almacenó a -20°C. En la muestra por cepillado, se agitó el cepillo para desprender las células adheridas en el agua milli-Q. Posteriormente el cepillo se introdujo en un tubo *ependorff* de 1,5mL y se almacenó a -20°C.

La extracción del ADN se realizó de forma directa en el caso del cepillo; mientras que para la muestra del enjuague se realizaron varios procesos de centrifugación para recuperar el pellet celular. Ambas muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 15 minutos, y se retiró el sobrenadante.

Protocolo de la extracción del ADN:

- Añadir 180 µL de *buffer* ATL y 20 µL de proteinasa K a la muestra y mezclar en un agitador (vórtex), incubándolo a 56°C hasta la lisis completa (1-3h).
- Añadir otros 200 µL de *buffer* AL y la mezcla se vuelve a agitar durante 15 segundos.
- Incubar a 70°C durante 10 minutos y centrifugar brevemente para quitar las gotas de la tapa.
- Añadir 200 µL de etanol al 96-100% y agitar durante 15 segundos, para posteriormente volver a centrifugar un poco para retirar los restos de la tapa.

- Pipetear la mezcla a una mini columna QIAamp (en un tubo colector de 2 mL), y se centrifuga a 8000 rpm (6000 x g) durante 1 minuto, descartando el sobrenadante con el tubo colector.
- Colocar la mini columna de extracción QIAamp en un nuevo tubo de colección de 2 mL y añadir 500 µL de *buffer* AW1. Centrifugar a 8000 rpm (6000 x g) durante 1 minuto y descartar el sobrenadante.
- Colocar la mini columna de extracción QIAamp en un nuevo tubo de colección de 2 mL y añadir 500 µL de *buffer* AW2. Centrifugar a máxima velocidad (14,000 rpm) durante 3 minutos y descartar el sobrenadante.
- Colocar la mini columna de extracción QIAamp en un nuevo tubo de colección de 2 mL y centrifugar a máxima velocidad durante 1 minuto, eliminando los restos de *buffer* AW2.
- Colocar la mini columna QIAamp en un nuevo tubo microcentrifugado de 1,5 mL y añadir 200 µL de *buffer* AE o agua destilada, que se incubó a temperatura ambiente durante 1 minuto y se centrifuga a 8000 rpm (6000 x g) durante 1 minuto para diluir el ADN.
- Repetir el último paso para aumentar el rendimiento del ADN con 100 µL de *buffer* AE.

- *Cuantificación del ADN*

La cuantificación se realizó en el Laboratorio de Genética de Medicina y Patología Oral del Departamento de Estomatología II, bajo la dirección de los doctores Xabier Marichalar y Amaia Setien.

Para ello, se utilizó el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 (Waltham, Estados Unidos), que cuantifica muestras de ácidos nucleicos de 1 µL de volumen con

una alta precisión y reproducibilidad. El espectro oscila desde los 220 hasta los 750 nm y utiliza una tecnología de retención de la muestra que emplea la tensión superficial únicamente para mantener la muestra en su lugar. Esto elimina la necesidad de emplear cubetas y otros dispositivos de contención de muestra.

Para la cuantificación del ADN se empleó el ratio 260/280 (relación de la absorbancia de la muestra a 260 y 280 nm). Esta relación de absorbancia se utiliza para evaluar la pureza del ADN. Una relación de 1,8 es generalmente aceptada como “pura” para el ADN. Si este valor es ligeramente más bajo, pueden existir sales o posibles componentes que se hayan purificado junto con el ADN.

Protocolo de la cuantificación del ADN:

- Realizar la medición del “blanco” (solución donde se ha llevado a cabo la resuspensión del ADN tras su extracción, y que no presenta ningún tipo de ácido nucleico; suele ser agua milli-Q.).
- Depositar 1  $\mu$ L de la muestra en el lector, sin hacer burbujas ya que esto impediría la correcta cuantificación.
- Cerrar el lector cuidadosamente y se procede a la cuantificación.
- Limpiar con un paño seco y volver a repetir los dos primeros pasos.

- *Análisis de genotipado*

El análisis del genotipado se ha realizado en la Unidad de Genómica SGIker de la UPV/EHU, con el sistema FLUIDIGM y chips IFCs 96.96 JUNO™ (South San Francisco, Estados Unidos).

Protocolo del genotipado:

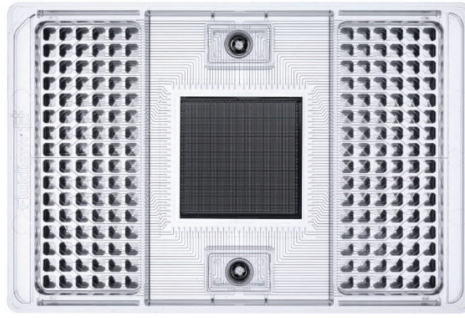
En base a los *loci* que se quieren analizar, se solicitó un diseño de sondas *SNPtype* (Fluidigm®). Se recibieron tres placas independientes con el conjunto de sondas *SNPtype* necesarias:

- *SNPtype STA probes: Specific Target Amplification primers.*
- *SNPtype LSP probes: Locus-Specific Primer (reverse).*
- *SNPtype ASP probes: Allele-Specific Primers ASP1/ASP2 (Fwd).*

La obtención del ADN se hizo por fluorimetría, en concentraciones entre 2,5–250 ng/uL para que los parámetros de calidad espectrofotométricos estén en valores óptimos. Para cada set de 94 muestras + 2 negativos, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Reacción STA (*Specific Target Amplification*): con las sondas STA y LSP se coamplifica de forma conjunta el total de regiones genómicas que contienen cada uno de los SNP a analizar, consiguiendo la normalización previa de todas las muestras. Esta reacción realiza en termocicladores Veriti™ de Applied Biosystems™ (Waltham, Estados Unidos), utilizando el protocolo de PCR establecido por Fluidigm (1,25 ul ADN + 3.75 ul *sample master mix*).
2. Cargado del chip: mediante un controlador de cargado (IFC - *integrated fluidic circuits - controller*) se lleva a cabo el cargado del chip 96.96 JUNO (Dynamic Array IFC), en el que previamente se han pipeteado las muestras en los pocillos correspondientes (**Figura 8**):
  - Muestras (5 uL): 2.75 uL procedentes de la reacción STA previa (diluidas 1/100) + 2.25 uL de *sample master mix*.
  - Assays (4 uL): mezcla de las sondas LSP y ASP para cada SNP a analizar.





**Figura 8.** JUNO 96.96 Dynamic Array™ IFC for Genotyping

3. RT-PCR alelo específica y toma de datos: se procede a la amplificación alelo-específica para cada SNP y cada muestra, mediante una RT-PCR en el termociclador del Biomark HD System (siguiendo el protocolo de Fluidigm). Después, la toma de datos se realiza con el software Biomark Data Collection (Fluidigm) (**Figura 9**).
4. Genotipado de SNP (SNP Genotyping Analysis Software, Fluidigm): Inicialmente se programó realizar el genotipado de 96 SNP (**Tabla 1**).



**Figura 9.** Juno™ IFC controller (izquierda) y Biomark HD systems™ (derecha).

Para la elección final, se realizó una revisión sistemática de la literatura (**Anexo 1**), y después se estudió la presencia de los SNPs en población caucásica de la CAPV. Finalmente se analizaron los genotipos más importantes en relación con el desarrollo de PI (**Tabla 2**).

Para la selección de los SNPs se realizó el análisis del Equilibrio de Hardy-Weinberg con el test de la Chi-cuadrado. En una población considerada ideal, con tamaño infinito, individuos diploides, con una reproducción sexual, sin diferencias alélicas entre los sexos y sin perturbaciones por efectos de mutación, migración, selección o deriva, las frecuencias alélicas alcanzan un equilibrio que se conoce como Equilibrio de Hardy-Weinberg. Bajo este equilibrio, las frecuencias genotípicas esperadas están en función de las frecuencias alélicas (p y q):

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

Donde p y q corresponden a las frecuencias alélicas del sistema bialélico;  $p^2$  y  $q^2$  son las frecuencias de los genotipos homocigotos; y  $2pq$  la frecuencia genotípica del heterocigoto. Cuando se acepta la hipótesis nula ( $p \geq 0,05$ ), se determina que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg para el locus en ese momento particular. Cuando se rechaza la hipótesis nula ( $p < 0,05$ ), se concluye que la población no se distribuye según lo esperado, debido a alguna variación que está ocurriendo en dicha población.

**Tabla 1.** SNPs analizados en el *array* inicial.

ADR $\alpha$ 1 $\alpha$ : rs1383914, rs1048101
ADR $\beta$ 2: rs1042713
BMP4: rs17563
BRAF: rs10487888
BRINP3: rs1935881
CD14: rs2569190
CHST11: rs835487
COL1 $\alpha$ 1: rs1800012
COMT: rs4680, rs165599
DROSHA: rs7719666, rs3805500
DRD2: rs6277
ENPP1: rs858339
ESR1: rs2234693, rs1643821
FGF3: rs4631909
FGF10: rs900379
GBP-1: rs7911
GDF5: rs143383
GFR $\alpha$ 1: rs3781545
HTR2A: rs6311
IL1 $\beta$ : rs16944, rs1143627
IL6: rs1800795
IL10: rs1800896
JAK2: rs2274471
KCNS1: rs734784
LOC107986766: rs2097903
LRP1: rs11172113
LTF: rs1126477, rs17078864, rs12629300, rs17141154, rs1034383, rs6441990, rs6441995, rs7629657, rs9862186
MTHFR: rs1801131, rs2236225
MTRR: rs1801394
OPG: rs2073617
POLR1C: rs699937
PRK $\alpha$ : rs887797
RANKL: rs9533156
RGS7: rs6689169
RGS13: rs3795617
RXP2: rs1531554
SSTR2: rs7210080
SCN9 $\alpha$ : rs12620053, rs4453709, rs7607967, rs13017637
SHMT1: rs1979277
SMAD3: rs12901499
SMC1B: rs3747238
SNAP25: rs3746544
SUFU: rs11594179
TGF $\beta$ 1: rs1800469
TNKS1BP: rs11602501
TRPV2: rs395357
TSC1: rs3827665
UPP2: rs7565931

**Tabla 2.** SNPs relacionados con el proceso de osteointegración de los implantes.

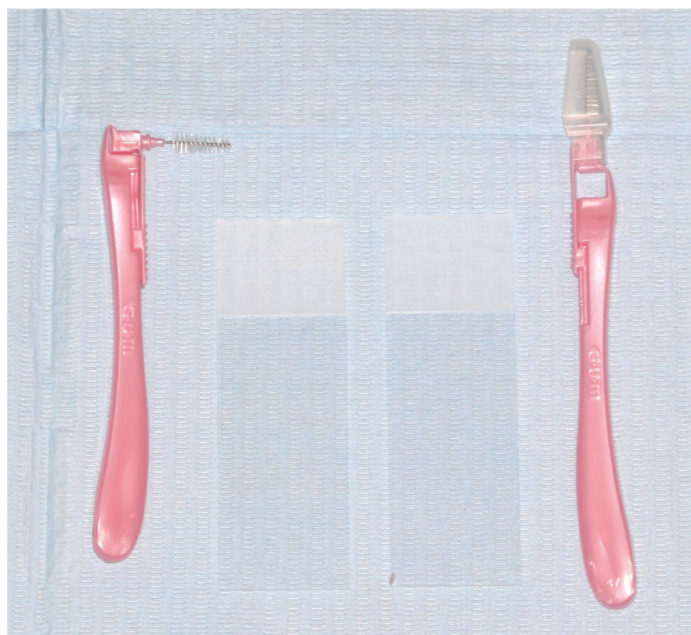
<b>Proteínas de la respuesta inflamatoria</b>
GBP1: rs7911
IL1 $\beta$ : rs16944
IL6: rs1800795
IL10: rs1800896
<b>Proteínas del remodelado óseo</b>
BMP4: rs17563
BRINP3: rs1935881
CD14: rs2569190
FGF3: rs4631909
FGF10: rs900379
LTF: rs1126477
OPG: rs2073617
RANKL: rs9533156

### 3.2.2. Muestra para el análisis citológico

#### 3.2.2.1. Toma de la muestra citológica

Se tomaron 3 muestras para el estudio citológico (**Figura 10**). En el GCO se tomaron dos muestras citológicas del implante con PI (distal y mesial) y una muestra citológica del implante en salud (en caso de presentar implantes con y sin PI). En los casos con varios casos con PI, la muestra del implante con PI se obtuvo siempre del implante con mayor grado de POM. En el GCO se tomó una muestra citológica de un implante dental en salud peri-implantaria.

Las muestras citológicas se tomaron mediante raspado de la mucosa peri-implantaria durante 10 segundos, realizando deslizamientos y rotaciones con ligera presión para no dañar los tejidos peri-implantarios (tres veces). La toma citológica se realizó con un microcepillo interdentario de angulación variable GUM® *Bi-Direction* (Etoy, Suiza) para cada implante.



**Figura 10.** Recogida de muestras. Kit para la extracción del material citológico: cepillos interdentales y portaobjetos.

El material obtenido se extendió en varios portaobjetos Superfrost® Plus (Thermo Scientific™ Waltham, Estados Unidos) codificados. Los extendidos fueron fijados mediante un spray fijador alcohólico estándar Kito-Fix Kaltek® (Saonara, Italia), se secaron al aire y se introdujeron en cajas cerradas portaobjetos.

#### 3.2.2.2. Análisis de la muestra citológica

El estudio y valoración de las muestras citológicas se realizó en el Laboratorio de Patología y Medicina Oral del Servicio Clínica Odontológica de la UPV/EHU.

- *Tinción*

En todos los extendidos citológicos se realizó la tinción de Papanicolaou.

La tinción de Papanicolaou es una técnica histológica clásica de tinción multicromática que se utiliza para diferenciar las células de frotis de diversas secreciones corporales. Para la coloración nuclear se usa la Hematoxilina de Harris (colorante alcohólico basófilo) y para la citoplasmática se utilizan dos colorantes alcohólicos que tiñen de forma diferencial las distintas células en función de la afinidad electrostática de cada colorante y el peso molecular. El Orange G tiñe los citoplasmas de células maduras bien diferenciadas con hiperqueratosis generando un color anaranjado. Por el contrario, el EA-50 es una mezcla de eosina, verde luz y pardo Bismarck. La eosina tiñe las células superficiales e intermedias (coloración eosinófila), el verde luz tiñe el citoplasma de las células menos diferenciadas basales y parabasales (coloración basófila), y el pardo Bismarck tiene afinidad por la mucina típica de las células endocervicales (Gill, 2013).

El protocolo para la tinción de Papanicolaou consta de diferentes pasos:

- Sumergir la muestra sucesivamente en alcohol de 80%, alcohol de 70%, alcohol de 50% y agua, 1 minuto en cada líquido.

- Teñir la muestra con la solución de Hematoxilina de Harris durante 5 minutos aproximadamente.
- Sumergir la muestra en agua 6 veces durante 1 segundo cada vez.
- Sumergir la muestra en ácido clorhídrico 0,5%, 8 veces durante 1 segundo cada vez.
- Lavar la muestra con agua corriente durante 5 minutos, y pasar la muestra por alcoholes de grado sucesivo, 50%, 70%, 80% y 96%, durante 30 segundos en cada uno de ellos.
- Teñir la muestra con Solución de Papanicolaou OG 6 durante 1 minuto.
- Lavar el exceso de colorante en dos baños de etanol 96%, durante 4 segundos cada vez.
- Teñir la muestra con solución de Papanicolaou EA 50 durante 2 minutos.
- Lavar la muestra en 3 recipientes distintos de etanol 96%, sumergiendo la preparación 2 veces durante 4 segundos cada vez.
- Lavar la muestra en etanol absoluto durante 30 segundos.
- Sumergir la muestra durante en un baño de isómeros y etanol absoluto (1:1) durante 4 minutos.
- Aclarar la muestra con xileno durante 3 minutos.
- Montar la preparación con medio de montaje.

### 3.2.2.3. Protocolo de identificación de elementos citológicos.

- *Variables en la valoración citológica*

La valoración de los extendidos citológicos se realizó por dos patólogos en la Unidad de Patología Oral y Maxilofacial de la UPV/EHU, tras observación en un microscopio

Olympus® (Tokio, Japón) BX51 multifocal, utilizando aumentos variables en función del nivel de observación (4x, 10x, 20x, 40x o 100x).

El protocolo específico de la valoración citológica recogía los siguientes datos:

- Cantidad de material citológico obtenido: ausente, escaso, abundante.
- Componentes: valores ausente, escaso, abundante.
  - Células epiteliales escamosas descamadas: superficiales (anucleadas) intermedias (nucleadas)
  - Detritus
  - Microbiota: Simple (cocos, bacilos) y Compleja (espiroquetas, mazorcas)
  - Células escamosas colonizadas por gérmenes
  - Células inflamatorias: polimorfonucleares, linfocitos, otras
  - Hematíes

Los análisis se llevaron a cabo 2 veces por cada patólogo y de manera ordenada, desde un extremo del portaobjetos al otro en sentido de las agujas del reloj. Se comenzó por una evaluación con un aumento de 10x y posteriormente se pasó a uno 20x o de 40x en virtud de las necesidades.

Para la valoración cuantitativa de cada variable se analizaron 4 áreas representativas del cada extendido citológico. La valoración se realizó como Ausente, Escaso y Abundante; siguiendo el protocolo establecido en la Tesis Doctoral del Dr. Francisco Javier Vallejo Aisa en 2017.

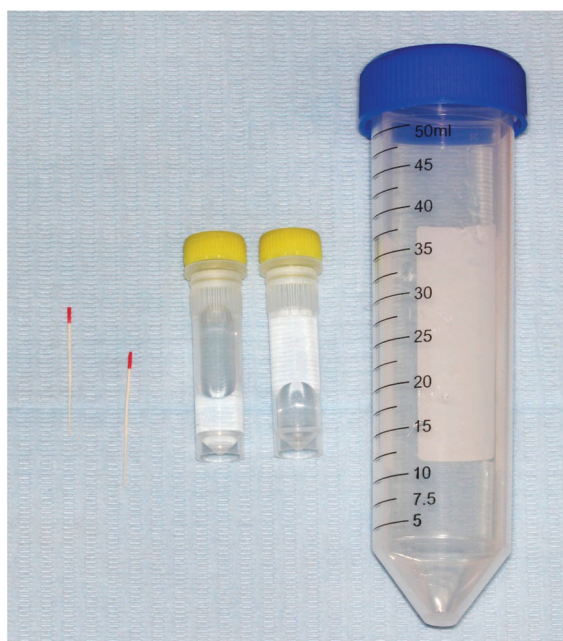


### 3.2.3. Muestra para el análisis micológico

#### 3.2.3.1. Toma de la muestra micológica

Se recogieron 2 tipos de muestras para el estudio micológico (**Figura 11**):

- Muestra por enjuague oral durante un minuto, con 20 mL de solución de agua milli-Q estéril. El contenido se recogió y se vertió en un tubo Falcon de 50 mL y se almacenó a una temperatura de  $-8^{\circ}\text{C}$ .
- Muestra por toma con punta de papel estéril, colocada durante 30 segundos en el surco peri-implantario. En el GCO se tomó una muestra del fluido peri-implantario de un implante en salud peri-implantaria y de un diente. En el GCA se tomó una muestra del fluido peri-implantario de un implante con PI (siempre del implante con mayor POM), de un implante sano y del fluido crevicular de un diente. El contenido se almacenó en un tubo *eppendorf* de 2,5 mL con 2 mL de agua milli-Q estéril y se almacenó a una temperatura de  $-8^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 11.** Recogida de muestras. Kit para la extracción del material micológico: puntas de papel, tubos *eppendorf* con 2 mL de agua milli-Q estéril y tubo Falcon con 20 mL de agua milli-Q estéril.

### 3.2.3.2. Análisis de la muestra micológica

El análisis de las muestras se ha realizado en el Laboratorio de Micología del Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología de la UPV/EHU, bajo la dirección de la Profesora Elena Eraso.

- *Centrifugación del material*

Primero se igualó el volumen obtenido con el enjuague (20 mL). El material obtenido se centrifugó durante 10 minutos, el enjuague a 5.000 rpm y el obtenido con las puntas de papel a 400 rpm, para recuperar el pellet celular. Después, se retiró el sobrenadante.

- *Cultivo y aislamiento micológico*

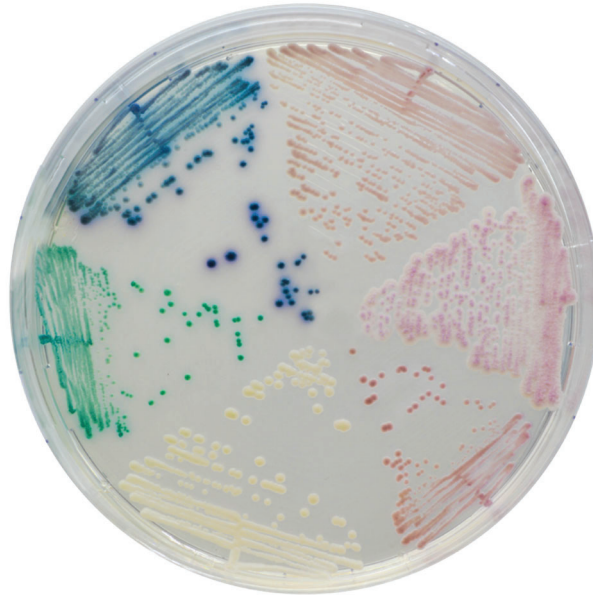
Se recogieron 100 mL del contenido de la muestra del enjuague (pellet) y 50 mL de las muestras de las puntas de papel y se dispersaron manualmente, por separado, en toda la superficie de una placa de *Candida* Chromogenic Agar/ CONDA (CondaLab®, Madrid, España). Todas las placas fueron incubadas a 36±1 °C. El crecimiento micológico fue evaluado a las 24, 48 y 72 horas.

- *Identificación de *Candida* spp.*

Primero se realizó una identificación presuntiva de *Candida* spp, mediante el análisis cuantitativo (unidades formadoras de colonias) y cualitativo (color, forma y textura) de las colonias.

CONDA es un medio de cultivo preparado para aislar e identificar algunas especies del género *Candida*, mediante hidrólisis específica de sustratos cromógenos ( $\beta$ -galactosidasa y otras hexosaminidasas) (**Figura 12**).

*Candida albicans*: Verde; *Candida dubliniensis*: Verde; *Candida glabrata*: Violeta;  
*Candida guilliermondi*: Rosa-violeta; *Candida krusei*: Rosa mate; *Candida parapsilosis*:  
Blanco; *Candida tropicalis*: Azul; *Saccharomyces cerevisiae*: Violeta



**Figura 12.** Diferenciación colorimétrica de las principales especies de *Candida spp.* de importancia clínica. *Candida* Chromogenic Agar/ CONDA (GranuCult® Merck KgaA, Darmstadt, Alemania).

Para el aislamiento de hongos filamentosos se utilizó el medio Agar DRBC (Diclorán-Rosa bengala-Cloranfenicol) (GranuCult® Merck KgaA, Darmstadt, Alemania). El DRBC es una modificación del Agar Rosa-Bengala-Cloranfenicol, con pH a 5,6, que contiene diclorán (0,002 g/l) y una menor concentración de Rosa-Bengala (0,025 g/l). El resultado es una mayor inhibición de bacterias y levaduras. La inclusión de dicloro inhibe la rápida propagación de los hongos mucoráceos y restringe el tamaño de las colonias de otros géneros, facilitando el recuento de colonias.

La confirmación final de las especies se realizó mediante pruebas de API ID 32C (bioMérieux, Marcy L'Étoile, Francia), y métodos moleculares de reacción en cadenas de polimerasa (PCR) y electroforesis en gel de agarosa.

API ID 32C es una prueba de asimilación de fuentes de carbono, cuya galería se compone de 32 cúpulas: 29 contienen cada una un sustrato carbonado deshidratado, una es el control negativo, otra detecta la sensibilidad a la cicloheximida y la última es una prueba colorimétrica para la esculina. Los sustratos son: sorbitol, D-xilosa, ribosa, glicerol, ramnosa, palatinosa, eritritol, melibiosa, glucoronato, melezitosa, gluconato, levulinato, glucosa, sorbosa, glucosamina, esculina, galactosa, actidiona, sacarosa, N-acetil-glucosamina, DL-lactato, Lárabinosa, celobiosa, rafinosa, maltosa, trehalosa, 2-cetol-gluconato, alfa-metil-D-glucósido, manitol, lactosa e inositol (Baires-Varguez et al., 2007).

Esta técnica permite la identificación de 63 especies diferentes de organismos levaduriformes o relacionados: *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Candida catenulata*, *Candida colliculosa*, *Candida dattila*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida globosa*, *Candida guilliermondii*, *Candida hellenica*, *Candida holmii*, *Candida inconspicua/norvegensis*, *Candida intermedia*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lambica*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitaniae*, *Candida magnoliae*, *Candida melibiosica*, *Candida membranifaciens*, *Candida norvegica*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida pulcherrima*, *Candida rugosa*, *Candida sake*, *Candida silvicola*, *Candida sphaerica*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida valida*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus terreus*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Debaryomyces etchellsii/carsonii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Geotrichum capitatum*, *Geotrichum spp*, *Kloeckera apis/apiculata*,

*Kloeckera japonica*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia farinosa*, *Rhodotorula glutinis*,  
*Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*  
*Saccharomyces kluyverii*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Stephanoascus ciferrii*,  
*Trichosporon inkin*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon mucoides*, *Williopsis saturnus*  
*Zygosaccharomyces spp.*

Protocolo de API ID 32C:

- Suspender un cultivo joven de la levadura a identificar en 2 mL de agua destilada estéril, hasta obtener una turbidez igual a 2 de McFarland.
- Transferir 250 µL de esta suspensión a una ampolla de C Medium y homogeneizar.
- Dispensar manualmente 135 µL de la suspensión anterior en cada cúpula de la bandeja con los diferentes substratos.
- Incubar la bandeja a 30±1 °C durante 24-48 h.

Para la lectura visual, se observa el crecimiento de las levaduras en comparación con la cúpula 0 (testigo negativo) (**Figura 13**). Una cúpula más turbia que el testigo indica una reacción positiva que debe anotarse en la hoja de resultados. En esta última, los test están separados en grupos de tres y se adjudica a cada uno en caso de positividad un valor diferente, 1 para el primero, 2 para el segundo y 4 para el que ocupa el tercer lugar; sumando cada triplete se obtiene un número de siete cifras que constituye el perfil numérico.

**Figura 13.** Ficha de resultados para la técnica API ID32C.

Para la discriminación final entre *Candida africana*, *C. dubliniensis* y *C. albicans* se realizó una PCR (CR-f/CR-r), mediante amplificación del gen hwp1: 700 pb para *C. albicans*, 569 pb para *C. dubliniensis* y 941 pb para *C. africana* (Romeo & Criseo, 2008).

El protocolo de qPCR consta de varias fases:

- Resuspender los *primers* liofilizados en agua milli-Q entre 10-100  $\mu$ M. La mezcla de reacción se prepara con *biomix* (Bioline 2x), agua milli-Q, CR *Reverse* y CR *Forward*.
- Introducir 20  $\mu$ L de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos de PCR. Con la punta de una pipeta se pica parte de una colonia aislada y se introduce la punta en los *eppendorfs* de PCR. Los tubos se cubren con una tapa especial y las tiras de *eppendorfs* se meten en el termociclador.
- Elaborar el gel de agarosa al 1,5%, mientras se amplifica el ADN. El gel se vierte en una cubeta con el peine encima hasta que gelifique. Después, el gel se introduce en la cubeta con TBE1x.
- Colocar 8  $\mu$ L de cada muestra sobre un parafilm y mezclar con 2  $\mu$ L de tampón de carga. Se retira el peine y se cargan las muestras.
- Cierra de la cubeta y puesta en marcha de la electroforesis a 90 V durante 90 minutos.
- Sacar el gel y observarlo en el transiluminador ChemiDoc™ BioRad (Hercules, Estados Unidos).

### 3.1. Análisis estadístico

En primer lugar, se llevó a cabo la descripción univariante. Las variables cualitativas se describieron con frecuencias y porcentajes. Para las variables cuantitativas, se procedió a analizar la normalidad con el test de Komogorov-Smirnov, el PP plot y el teorema central del límite. Si cumplían el supuesto de normalidad se empleó la media, la desviación estándar y el rango para describirlos. Si no lo cumplían, describimos las variables con la mediana y los percentiles 5, 25, 50, 75 y 95.

Para el análisis bivariante, se consideraron el tipo de variables:

Si las dos variables eran categóricas se empleó el test de la Chi cuadrado, y si las variables no estaban recogidas de forma dependiente, el test de McNemar.

Si una de las dos variables era cuantitativa (con distribución normal) y la variable categórica tenía 2 categorías, se usó la T de Student; si por el contrario la variable cuantitativa no presentaba una distribución normal, el test de U de Mann Whitney. Si la variable cualitativa tenía 3 o más categorías y la variable cuantitativa seguía una distribución normal, se llevó a cabo el análisis comparativo con el test ANOVA de un factor (en caso de que las varianzas fuesen homogéneas) o el test de Welch (si las varianzas no fuesen homogéneas). Si por el contrario la variable cualitativa tenía 3 o más categorías, pero la variable cuantitativa no seguía una distribución normal, se usó el test de Kruskal-Wallis.

Si las dos variables eran cuantitativas (normales) y estaban recogidas de forma independiente, se empleó el test de correlación de Pearson. Si las variables eran continuas (normales) y dependientes, el test T de Student para muestras relacionadas. Si una o las dos variables no seguía una distribución normal, se analizó la correlación mediante el test

de correlación de Spearman. Si las dos variables eran dependientes se usó el test de Rangos de Wilcoxon.

Finalmente, para el análisis multivariante, dependiendo de la variable dependiente, se utilizaron modelos de regresión lineal o modelos de regresión logística.

También se procedió al cálculo de la sensibilidad y la especificidad con los resultados del análisis citológico, para su valoración como método diagnóstico. Por un lado, la sensibilidad cuantifica la proporción de individuos enfermos diagnosticados realmente como enfermos; mientras que la especificidad cuantifica la proporción de individuos sanos realmente sanos.

Se consideró estadísticamente significativo cuando  $p < 0,05$ . Todos los análisis se llevaron a cabo con el programa estadístico IBM® SPSS® v.28.





## 4. RESULTADOS

### 4.1. Pacientes

#### 4.1.1. Datos generales

Hemos estudiado 161 pacientes que correspondían a 91 (56,50%) mujeres y 70 (43,50%) hombres, con una edad media de  $60,90 \pm 10,22$  años en el momento del estudio (rango 31-86). El número de mujeres ha sido ligeramente mayor, tanto en el grupo caso (GCA) (n: 43; 53,80%) como en el control (GCO) (n: 48; 59,30%) ( $p=0,580$ ) (**Tabla 3**).

La distribución etaria ha sido similar en ambos grupos de estudio; siendo la edad media en los pacientes del GCA de  $61,23 \pm 8,92$  años (rango: 31-77), y en el GCO de  $60,70 \pm 11,41$  años (rango: 31-86) ( $p=0,374$ ). La edad media de los pacientes en el momento de la colocación del primer implante fue de  $54,30 \pm 9,94$  años (rango: 24-85), manteniéndose parecida en el GCA ( $53,78 \pm 9,00$  años; rango: 31-74) y en el GCO ( $55,30 \pm 11,62$  años; rango: 28-85) ( $p=0,20$ ). El tiempo medio transcurrido hasta el desarrollo de la PI fue de  $4,61 \pm 2,5$  años (rango:  $\leq 1-10$  años); y la edad media de los pacientes en el momento de aparición de la PI fue de  $58,60 \pm 8,90$  años (rango: 32-76) (**Tabla 3**).

El tiempo de seguimiento clínico desde la colocación de los implantes ha variado desde 1 a 13 años, presentando una media de  $6,43 \pm 3,32$  años; y siendo este periodo mayor en el GCA (media:  $7,45 \pm 3,19$  años; rango: 2-13) que en el GCO (media:  $5,41 \pm 3,14$  años; rango: 1-13) ( $p < 0,01$ ) (**Tabla 3**).

En cuanto al consumo de tabaco, el 38,50% del total de pacientes (n: 62) no consumía tabaco y el 41,60% (n: 67) eran exfumadores, de los que la mayoría (92,50%; n: 62) consumió más de 10 cig/día. En el momento del estudio 32 pacientes (19,90%) consumían tabaco, de los que el 71% (n: 23) fumaba más de 10 cig/día.

En el análisis por grupos, el 27,50% (n: 22) de los individuos del GCA no consumía tabaco, frente al 49,40% (n: 40) del GCO ( $p < 0,05$ ). El número de fumadores de más de 10 cig/día era mayor en el GCA (n: 17; 21,40%) que en el GCO (n: 6; 7,40%) ( $p = 0,009$ ). También existía una mayor cantidad de pacientes exfumadores que habían consumido más de 10 cig/día en el grupo GCA (n: 35; 94,60%) que en el GCO (n: 27; 90%) ( $p = 0,650$ ) (**Tabla 3**).

En cuanto al consumo de alcohol, el 52,20% (n: 84) del total de participantes refería no consumir alcohol habitualmente y el 21,10% (n: 34) señaló que consumía más de 7 unidades/ semana; siendo esta cifra ligeramente mayor en el grupo GCA (n: 18; 22,50%) que en el GCO (n: 16; 19,80%) ( $p = 0,852$ ) (**Tabla 3**).

La hipertensión arterial ha sido el antecedente médico más frecuente en ambos grupos de estudio (n: 47; 29,20%), seguido de la hipercolesterolemia (n: 25; 15,50%), depresión (n: 13; 8,10%), hipotiroidismo (n: 12; 7,50%), asma (n: 11; 6,80%), diabetes mellitus II (n: 10; 6,20%) y enfermedad cardiovascular (n: 10; 6,20%). No hemos reconocido diferencias significativas en cuanto a su relación con la presencia de PI (**Tabla 3**).

#### **4.1.2 Datos clínicos orales**

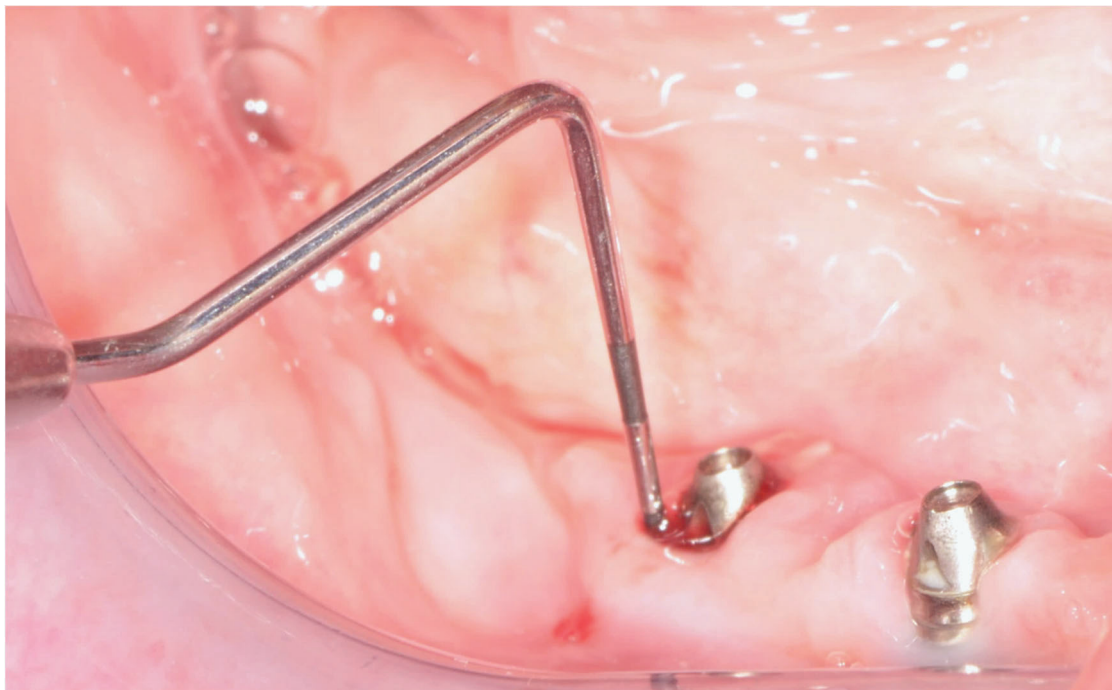
El 39,10% (n: 63) de los participantes en el estudio tenía el antecedente de padecer periodontitis. Esta cifra era ligeramente más elevada en el GCA (n: 34; 42,50%) que en el GCO (n: 29; 38,50%) ( $p = 0,38$ ) (**Tabla 3**).

Casi la mitad de los pacientes (n: 79; 49,10%) conservaban todos sus dientes, siendo mayor la cifra en el GCO (n: 44; 54,30%) que en el GCA (n: 35; 43,80%). Del resto de participantes, únicamente el 14,30% (n: 23) presentaba edentulismo total. Existía un mayor número de individuos con ausencia de dientes en el maxilar inferior (n: 44; 33,80%) que en el superior (n: 41; 31,50%) (**Tabla 3**).

En cuanto a la rehabilitación protésica que portaban los participantes, el 42% (n: 63) llevaba sólo coronas, el 40% (n: 60) sólo puentes, el 18,70% prótesis híbridas (n: 28), el 6,83% (n: 11) coronas y puentes, y el 2,50% (n: 4) prótesis sobredentaduras. Ha aparecido una asociación estadísticamente significativa entre los portadores de prótesis tipo puentes y la aparición de PI (n: 36; 48%) ( $p=0,046$ ). En el momento del estudio, todas las rehabilitaciones presentes estaban atornilladas (**Tabla 3**).

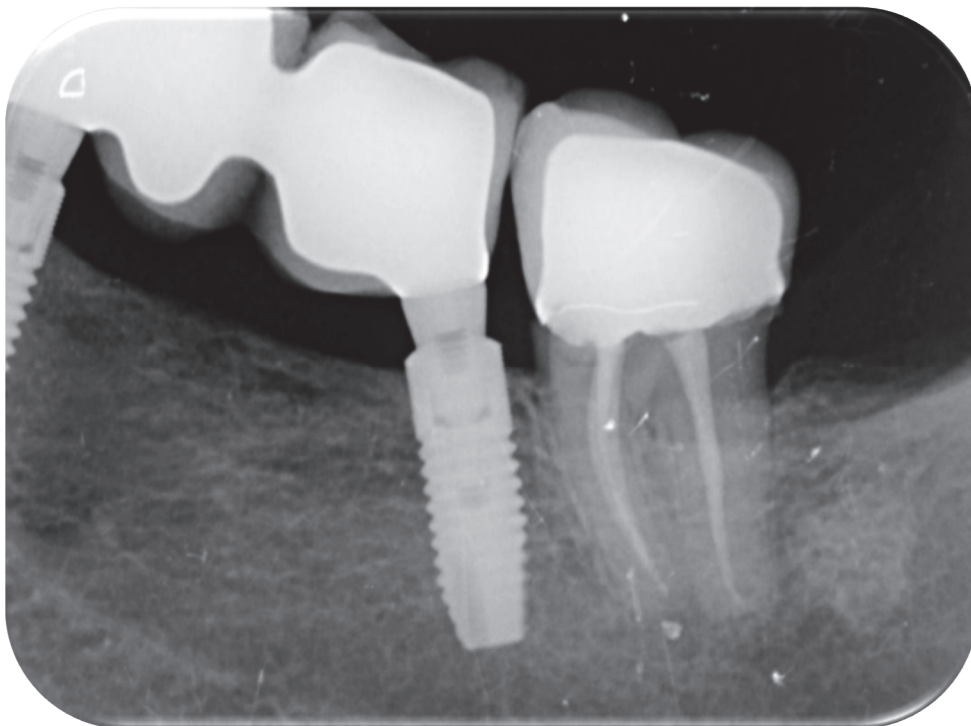
#### 4.1.3. Datos de los implantes

Los 161 individuos analizados en nuestro estudio portaban un total de 799 implantes, 418 en el GCA y 381 en el GCO. El número medio de implantes por participante fue de  $5,23 \pm 3,75$  en el GCA (rango: 1-14) y de  $4,70 \pm 3,22$  en el GCO (rango: 1-14) ( $p=0,172$ ). En total, 229 (28,66%) implantes estaban diagnosticados de PI (**Tabla 4**). El 31,25% de los pacientes del GCA había presentado PI en el último año.



**Figura 14.** Caso con Peri-implantitis. Exploración clínica de un implante dental con peri-implantitis (posición 4.6).

En el momento del estudio, la PS media de los implantes era de  $3,41 \pm 1,96$  mm (rango: 0-9 mm), la POM media de  $3,99 \pm 2,05$  mm (rango: 0-10 mm) y el 20% (n: 160) de los implantes sangraba al sondaje. En el análisis por grupos, los implantes con PI del GCA presentaban una PS media de  $5,13 \pm 1,25$  mm (rango: 2-9 mm) y una POM media de  $5,58 \pm 1,13$  mm (rango: 3-10 mm). Además, el 56,30% (n: 129) de los implantes presentaba BOP y el 14% supuraba (n: 32) (**Figura 14**). Por el contrario, la PS media de los implantes del GCO y de los implantes sanos del GCA era de  $1,72 \pm 1,00$  mm (rango: 0-3 mm), la de POM de  $2,42 \pm 1,18$  mm (rango: 0-4 mm), y el 5,40% (n: 31) presentó BOP en algún momento durante el mantenimiento (**Figura 15**). La PS, POM, BOP y la presencia de supuración al sondaje mostraron una asociación estadísticamente significativa con la presencia de PI ( $p < 0,001$ ) (**Tabla 4**).



**Figura 15.** Salud peri-implantaria. Radiografía intraoral periapical de un implante dental en salud peri-implantaria (posición 3.6).

El 60,20% (n: 481) del total de implantes se localizaba en el maxilar inferior y el 39,80% (n: 318) en el maxilar superior. Esta distribución se mantuvo similar en ambos grupos de estudio (**Tabla 4**) ( $p=0,713$ ). La localización de los implantes ha sido más frecuente en el sector posterior (n: 564; 71,10%) que en el anterior (n: 229; 28,90%), tanto en el GCA como en el GCO ( $p=0,676$ ) (**Tabla 4**).

**Tabla 3.** Datos generales y datos clínicos orales de los pacientes incluidos en el estudio.

Datos generales y clínicos	Grupo de estudio			p
	GCA (n: 80)	GCO (n: 81)	Total (n: 161)	
Sexo: n (%)				
• Mujer	43 (53,80)	48 (59,30)	91 (56,50)	0,58
• Hombre	37 (46,30)	33 (40,70)	70 (43,50)	
Edad en el estudio (años)				
• Media $\pm$ SD	61,23 $\pm$ 8,92	60,70 $\pm$ 11,41	60,90 $\pm$ 10,22	0,37
• Rango	(37-77)	(31-86)	31-86	
Edad colocación implante (años)				
• Media $\pm$ SD	53,78 $\pm$ 9,00	55,30 $\pm$ 11,62	54,30 $\pm$ 9,94	0,20
• Rango	(31-74)	(28-85)	(28-85)	
Edad desarrollo PI (años)				
• Media $\pm$ SD	-	58,60 $\pm$ 8,90	-	-
• Rango		(32-76)		
Tiempo seguimiento (años)				
• Media $\pm$ SD	7,45 $\pm$ 3,19	5,41 $\pm$ 3,14	6,43 $\pm$ 3,32	<b>&lt;0,01</b>
• Rango	(2-13)	(1-13)	(1-13)	
Consumo de tabaco: n (%)				
• No fumador	22 (27,50)	40 (49,40)	62 (38,50)	<b>&lt;0,05</b>
• <10 cig/día	4 (5)	5 (6,20)	9 (5,60)	
• $\geq$ 10 cig/día	17 (21,40)	6 (7,40)	23 (14,20)	<b>0,01</b>
• Exfumador <10 cig/día	2 (5,40)	3 (10)	5 (7,50)	0,65
• Exfumador $\geq$ 10 cig/día	35 (94,60)	27 (90)	62 (92,50)	
Consumo de alcohol: n (%)				
• No bebedor	42 (53,50)	42 (51,90)	84 (52,20)	0,85
• <7 U/sem	20 (25)	23 (28,40)	43 (26,70)	
• $\geq$ 7 U/sem	18 (22,50)	16 (19,80)	34 (21,10)	
Antecedentes médicos: n (%)				
• Hipertensión arterial	22 (27,50)	25 (30,90)	47 (29,20)	0,22
• Hipercolesterolemia	12 (15)	13 (16)	25 (15,50)	0,85
• Depresión	4 (5)	9 (11,10)	13 (8,10)	2,03
• Hipotiroidismo	7 (8,80)	5 (6,20)	12 (7,50)	0,39
• Asma	6 (7,50)	6 (6,20)	11 (6,80)	0,11
• Diabetes mellitus II	4 (5)	6 (7,40)	10 (6,20)	0,39
• Enfermedad cardiovascular	4 (5)	6 (7,60)	10 (6,20)	0,33
• Cáncer	4 (5)	5 (6,2)	9 (5,60)	0,10
• Hernia de hiato	3 (3,8)	5 (6,2)	8 (5)	0,19
Antecedente periodontitis: n (%)				
• Si	34 (42,50)	29 (35,80)	63 (39,10)	0,38
• No	46 (57,50)	52 (64,20)	98 (60,90)	
Edentulismo: n (%)				
• Total	12 (15)	11 (13,60)	23 (14,30)	0,39
• Sector anterior	5 (7,60)	2 (3,10)	7 (5,40)	0,21
• Sector posterior	20 (31,30)	29 (43,90)	49 (37,70)	0,54
• Maxilar inferior	25 (37,90)	19 (29,70)	44 (33,80)	0,97
• Maxilar superior	25 (37,90)	16 (25)	41 (31,50)	0,11
Rehabilitación protésica: n (%)				
• Coronas	26 (34,70)	37 (49,30)	63 (42)	0,07
• Coronas y puentes	6 (7,40)	5 (6,30)	11 (6,80)	0,77
• Puentes	36 (48)	24 (32)	60 (40)	<b>0,06</b>
• Híbrida	16 (20)	12 (14,80)	28 (18,70)	0,39
• Sobredentadura	0 (0)	4 (4,90)	4 (2,50)	0,13

**Tabla 4.** Datos clínicos de los implantes analizados en el estudio.

Dato clínico	Grupo de estudio			p
	GCA (n: 418)	GCO (n: 381)	Total (n: 799)	
Implantes (n) • Media • Rango	5,23±3,75 (1-14)	4,70±3,22 (1-14)	4,96±3,49 (1-14)	0,17
Diagnóstico peri-implantario • Peri-implantitis • Salud peri-implantaria	229 (54,78) 189 (45,22)	- 381 (100)	229 (28,66) 570 (71,34)	-
Dato clínicos	Grupo de estudio			p
	GCA PI (n: 229)	GCA sin PI y GCO (n: 570)	Total (n: 799)	
PS (mm) • Media ± SD • Rango	5,13±1,25 (2-9)	1,72±1,00 (0-3)	3,41±1,96 (0-9)	<0,01
POM (mm) • Media ± SD • Rango	5,58±1,13 (3-10)	2,42±1,18 (0-4)	3,99±2,05 (0-10)	<0,01
BOP: n (%) • Si • No	129 (56,30) 100 (43,80)	31 (5,40) 539 (94,60)	160 (20) 639 (80)	<0,01
Supuración: n (%) • Si • No	32 (14) 197 (86)	0 (0) 570 (100)	32 (4) 767 (96)	<0,01
Localización: n (%) • Sector anterior • Sector posterior • Maxilar superior • Maxilar inferior	68 (29,70) 161 (70,30) 87 (38) 142 (62)	167 (29,30) 403 (70,70) 221 (38,80) 349 (61,20)	229 (28,90) 564 (71,10) 318 (39,80) 481 (60,20)	0,71 0,68



## 4.2. Estudio genético

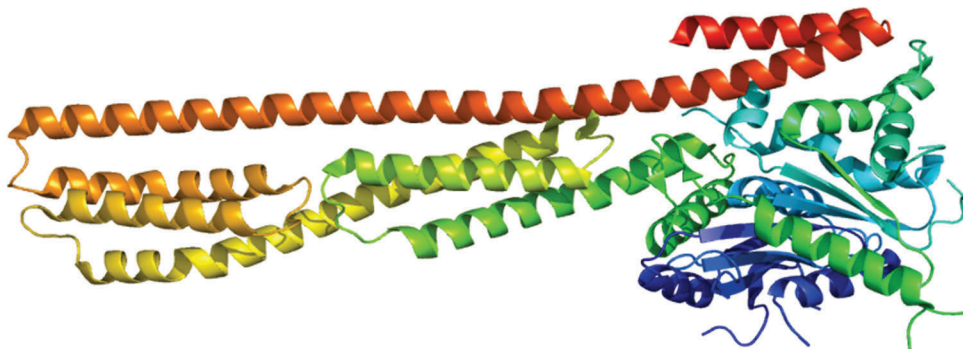
### 4.2.1. Análisis general

Se realizó el análisis de las muestras genéticas en 154 participantes, 75 del GCA y 79 del GCO, que correspondían a 87 mujeres y 66 hombres, y presentaban una edad media de  $60,90 \pm 10,20$  años en el momento del estudio.

Se han estudiado 12 SNPs relacionados con la respuesta inflamatoria (GBP1: rs7911; IL1 $\beta$ : rs16944; IL6: rs1800795; IL10: rs1800896) y con el remodelado óseo (BMP4: rs17563; BRINP3: rs1935881; CD14: rs2569190; FGF3: rs4631909; FGF10: rs900379; LTF: rs1126477; OPG: rs2073617; RANKL: rs9533156).

En el análisis comparativo entre el GCO y el GCA, se ha reconocido una diferencia estadísticamente significativa en los polimorfismos rs7911 de GBP1 ( $p=0,04$ ) y rs1935881 de BRINP3 ( $p=0,01$ ) (**Figura 16**) (**Tablas 5-6**). No hemos reconocido ninguna otra relación significativa entre ningún otro SNP relacionado con la inflamación o con el remodelado óseo y la aparición de PI (**Tablas 4-5**).

Los resultados del resto de SNPs incluidos en el *array* se muestran en el **Apéndice 3**. No hemos identificado ningún SNP de los estudiados que muestre una relación estadísticamente significativa con los pacientes diagnosticados de PI.



**Figura 16.** Estructura de la proteína GBP1.

**Tabla 5.** SNPs de proteínas de la respuesta inflamatorias: Análisis comparativo por grupos.

Gen-SNP	Genotipo	Grupo de estudio: n (%)		p
		GCA	GCO	
GBP1 rs7911	CC	16 (21,6)	12 (15,2)	<b>0,04</b>
	CT	28 (37,9)	46 (58,2)	
	TT	30 (40,5)	21 (26,6)	
IL1 $\beta$ rs16944	AA	7 (9,50)	6 (7,6)	0,80
	AG	37 (50)	37 (46,8)	
	GG	30 (40,5)	36 (45,6)	
IL6 rs1800795	CC	9 (12,3)	6 (7,7)	0,62
	CG	37 (50,7)	43 (55,1)	
	GG	27 (37)	29 (37,2)	
IL10 rs1800896	AA	23 (31,1)	33 (41,8)	0,39
	AG	37 (50)	33 (41,8)	
	GG	14 (18,9)	13 (16,4)	

**Tabla 6.** SNPs de proteínas del remodelado óseo: Análisis comparativo por grupos.

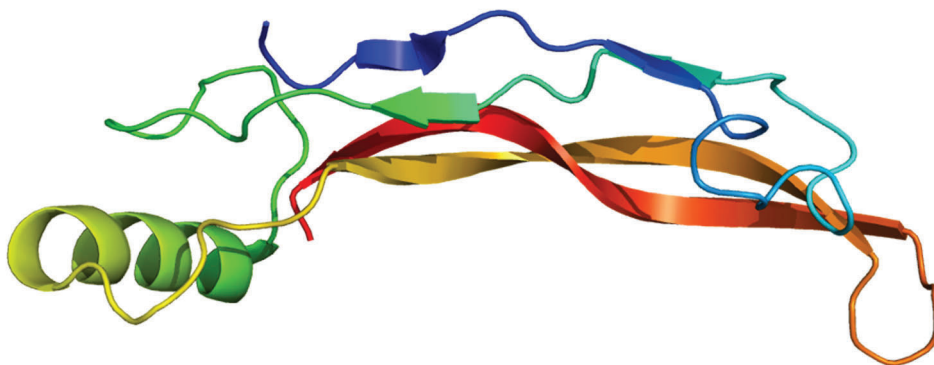
Gen-SNP	Genotipo	Grupo de estudio: n (%)		p
		GCA	GCO	
BMP4 rs17563	CC	20 (27)	16 (20,3)	0,60
	CT	34 (46)	41 (51,9)	
	TT	20 (27)	22 (27,8)	
BRINP3 rs1935881	AA	41 (55,4)	26 (32,9)	<b>0,01</b>
	AG	25 (33,8)	45 (57)	
	GG	8 (10,8)	8 (10,1)	
CD14 rs2569190	AA	18 (24,3)	16 (20,3)	0,59
	AG	36 (48,7)	45 (57)	
	GG	20 (27)	18 (22,7)	
FGF3 rs4631909	CC	17 (23)	18 (22,8)	0,69
	CT	32 (43,2)	39 (49,4)	
	TT	25 (33,8)	22 (27,8)	
FGF10 rs900379	CC	11 (14,9)	8 (10,1)	0,64
	CT	31 (41,9)	33 (41,8)	
	TT	32 (43,2)	38 (48,1)	
LTF rs1126477	AA	5 (6,8)	3 (3,8)	0,41
	AG	27 (36,5)	23 (29,5)	
	GG	42 (56,7)	52 (66,7)	
OPG rs2073617	CC	11 (14,9)	18 (22,8)	0,46
	CT	36 (48,6)	36 (45,6)	
	TT	27 (36,5)	25 (31,6)	
RANKL rs9533156	CC	12 (16,2)	15 (19)	0,90
	CT	37 (50)	38 (48,1)	
	TT	25 (33,8)	26 (32,9)	

#### 4.2.2. Análisis genético y factores de riesgo

Hemos analizado 12 SNPs implicados en la respuesta inflamatoria y el remodelado óseo (GBP1: rs7911; IL1 $\beta$ : rs16944; IL6: rs1800795; IL10: rs1800896; BMP4: rs17563; BRINP3: rs1935881; CD14: rs2569190; FGF3: rs4631909; FGF10: rs900379; LTF: rs1126477; OPG: rs2073617; RANKL: rs9533156), en relación con los factores de riesgo reconocidos de la PI (Schwarz et al., 2018).

Se ha reconocido una asociación estadísticamente significativa entre la presencia del SNP rs2073617 de OPG en pacientes del GCA que eran fumadores de más de 10 cig/día ( $p=0,03$ ); así como entre la presencia de los SNP rs17563 de BMP4 ( $p=0,02$ ) y rs1893047 de FGF3 ( $p=0,014$ ) en pacientes del GCA que padecían diabetes mellitus II (**Figura 17**) (**Tablas 7-8**).

No hemos reconocido ninguna asociación entre el resto de SNPs que hemos analizado de proteínas que participan en la respuesta inflamatoria y el remodelado óseo, y otros factores de riesgo para la PI, como el antecedente de periodontitis (**Apéndice 4**).



**Figura 17.** Estructura de la proteína BMP4.

**Tabla 7.** SNPs de proteínas de la respuesta inflamatoria y el remodelado óseo: Análisis por factores de riesgo: Consumo de tabaco.

Gen-SNP	Genotipo	GCA			p	GCO			p
		Consumo de tabaco: n (%)				Consumo de tabaco: n (%)			
		No	<10 cig/día	≥10 cig/día		No	<10 cig/día	≥10 cig/día	
GBP1 rs7911	CC	1 (6,67)	1 (50)	4 (33,33)	0,30	5 (12,82)	0 (0)	2 (33,33)	0,51
	CT	6 (40)	1 (50)	4 (33,33)		21 (53,85)	3 (60)	3 (50)	
	TT	8 (53,33)	0 (0)	4 (33,33)		13 (33,33)	2 (40)	1 (16,67)	
IL1β rs16944	AA	0 (0)	0 (0)	1 (8,33)	0,11	1 (2,56)	1 (20)	0 (0)	0,22
	AG	7 (46,67)	2 (100)	5 (41,67)		19 (48,72)	3 (60)	5 (83,33)	
	GG	8 (53,33)	0 (0)	6 (50)		19 (48,72)	1 (20)	1 (16,67)	
IL6 rs1800795	CC	1 (7,14)	0 (0)	3 (25)	0,46	6 (15,79)	0 (0)	0 (0)	0,45
	CG	8 (57,14)	2 (100)	5 (41,67)		17 (44,74)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	5 (35,72)	0 (0)	4 (33,33)		15 (39,47)	2 (40)	2 (33,33)	
IL10 rs1800896	AA	9 (60)	0 (0)	4 (33,33)	0,37	18 (46,15)	2 (40)	0 (0)	0,06
	AG	5 (33,33)	2 (100)	7 (58,33)		13 (33,33)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	1 (6,67)	0 (0)	1 (8,33)		8 (20,51)	0 (0)	2 (33,33)	
BMP4 rs17563	CC	5 (33,33)	1 (50)	3 (25)	0,41	7 (17,95)	0 (0)	1 (16,67)	0,50
	CT	9 (60)	1 (50)	5 (41,67)		22 (56,41)	2 (40)	3 (50)	
	TT	1 (6,67)	0 (0)	4 (33,33)		10 (25,64)	3 (60)	2 (33,33)	
BRINP3 rs1935881	AA	10 (66,67)	1 (50)	6 (50)	0,89	12 (30,77)	0 (0)	2 (33,33)	0,17
	AG	4 (26,67)	1 (50)	5 (41,67)		22 (56,41)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	1 (6,67)	0 (0)	1 (8,33)		5 (12,82)	2 (40)	0 (0)	
CD14 rs2569190	AA	2 (13,33)	2 (100)	2 (16,67)	0,08	8 (20,51)	0 (0)	2 (33,33)	0,23
	AG	9 (60)	0 (0)	7 (58,33)		23 (58,97)	2 (40)	2 (33,33)	
	GG	4 (26,67)	0 (0)	3 (25)		8 (20,51)	3 (60)	2 (33,33)	
FGF3 rs1893047	AA	6 (40)	1 (50)	2 (16,67)	0,35	10 (25,64)	0 (0)	1 (16,67)	0,35
	AG	7 (46,67)	0 (0)	8 (66,67)		20 (51,28)	3 (60)	2 (33,33)	
	GG	2 (13,33)	1 (50)	2 (16,66)		9 (23,08)	2 (40)	3 (50)	
FGF10 rs900379	CC	3 (20)	1 (50)	1 (8,30)	0,43	1 (2,56)	0 (0)	0 (0)	0,18
	CT	9 (60)	0 (0)	8 (66,70)		7 (17,95)	4 (80)	4 (66,67)	
	TT	3 (20)	1 (50)	3 (25)		31 (79,49)	1 (20)	2 (33,33)	
LTF rs1126477	AA	0 (0)	0 (0)	1 (8,33)	0,15	6 (15,38)	1 (20)	0 (0)	0,34
	AG	4 (26,67)	1 (50)	8 (66,67)		14 (35,9)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	11 (73,33)	1 (50)	3 (25)		19 (48,72)	1 (20)	2 (33,33)	
OPG rs2073617	CC	2 (13,30)	0 (0)	3 (25)	0,03	7 (17,95)	1 (20)	3 (50)	0,43
	CG	7 (46,70)	2 (100)	9 (75)		16 (41,03)	3 (60)	2 (33,33)	
	GG	6 (40)	0 (0)	0 (0)		16 (41,03)	1 (20)	1 (16,67)	
RANKL rs9533156	CC	1 (6,67)	0 (0)	4 (33,33)	0,28	8 (20,51)	1 (20)	1 (16,67)	0,10
	CT	9 (60)	2 (100)	5 (41,67)		18 (46,15)	2 (40)	3 (50)	
	TT	5 (33,33)	0 (0)	3 (25)		13 (33,33)	2 (40)	2 (33,33)	

**Tabla 8.** SNP de proteínas de la respuesta inflamatoria y el remodelado óseo: Análisis por factores de riesgo: Diabetes mellitus II.

Gen-SNP	Genotipo	GCA		p	GCO		p
		Diabetes Mellitus II: n (%)			Diabetes Mellitus II: n (%)		
		No	Si		No	Si	
GBP1 rs7911	CC	10 (18,52)	1 (33,33)	0,81	12 (16,44)	0 (0)	0,22
	CT	19 (35,19)	1 (33,33)		43 (58,9)	3 (50)	
	TT	25 (46,20)	1 (33,33)		18 (24,66)	3 (50)	
IL1 $\beta$ rs16944	AA	6 (11,11)	1 (33,33)	0,22	4 (5,48)	2 (33,33)	0,09
	AG	26 (48,15)	0 (0)		34 (46,58)	3 (50)	
	GG	22 (40,74)	2 (66,67)		35 (47,95)	1 (16,67)	
IL6 rs1800795	CC	8 (15,09)	0 (0)	0,73	6 (8,33)	0 (0)	0,57
	CG	26 (49,06)	2 (66,67)		39 (54,17)	4 (66,67)	
	GG	19 (35,85)	1 (33,33)		27 (37,5)	2 (33,33)	
IL10 rs1800896	AA	18 (33,33)	2 (66,67)	0,47	30 (41,1)	3 (50)	0,90
	AG	29 (53,7)	1 (33,33)		31 (42,47)	2 (33,33)	
	GG	7 (12,97)	0 (0)		12 (16,44)	1 (16,67)	
BMP4 rs17563	CC	13 (24,10)	3 (50)	<b>0,02</b>	15 (20,55)	1 (16,67)	0,73
	CT	28 (51,90)	0 (0)		37 (50,68)	4 (66,67)	
	TT	13 (24)	3 (50)		21 (28,77)	1 (16,67)	
BRINP3 rs1935881	AA	29 (53,70)	2 (66,67)	0,83	23 (31,51)	3 (50)	0,40
	AG	20 (37,04)	1 (33,33)		42 (57,53)	3 (50)	
	GG	5 (9,26)	0 (0)		8 (10,96)	0 (0)	
CD14 rs2569190	AA	13 (24,07)	1 (33,33)	0,57	15 (20,55)	1 (16,67)	0,88
	AG	26 (48,15)	2 (66,67)		41 (56,16)	4 (66,67)	
	GG	15 (27,78)	0 (0)		17 (23,29)	1 (16,67)	
FGF3 rs1893047	AA	14 (25,90)	0 (0)	<b>0,01</b>	13 (17,81)	2 (33,33)	0,60
	AG	28 (51,90)	0 (0)		38 (52,05)	2 (33,33)	
	GG	12 (22,20)	3 (100)		22 (30,14)	2 (33,33)	
FGF10 rs900379	CC	11 (20,40)	0 (0)	0,56	8 (10,96)	0 (0)	0,41
	CT	21 (38,90)	2 (66,70)		31 (42,47)	2 (33,33)	
	TT	22 (40,70)	1 (33,33)		34 (46,58)	4 (66,67)	
LTF rs1126477	AA	5 (9,26)	0 (0)	0,48	16 (21,92)	2 (33,33)	0,77
	AG	18 (33,33)	2 (66,67)		34 (46,58)	2 (33,33)	
	GG	31 (57,41)	1 (33,33)		23 (31,51)	2 (33,33)	
OPG rs2073617	CC	8 (14,81)	1 (33,33)	0,38	15 (20,55)	0 (0)	0,11
	CT	26 (48,15)	2 (66,67)		33 (45,21)	5 (83,33)	
	TT	20 (37,04)	0 (0)		25 (34,25)	1 (16,67)	
RANKL rs9533156	CC	7 (12,96)	0 (0)	0,76	2 (2,78)	1 (16,67)	0,06
	CT	27 (50)	2 (66,67)		23 (31,94)	0 (0)	
	TT	20 (37,04)	1 (33,33)		47 (65,28)	5 (83,33)	

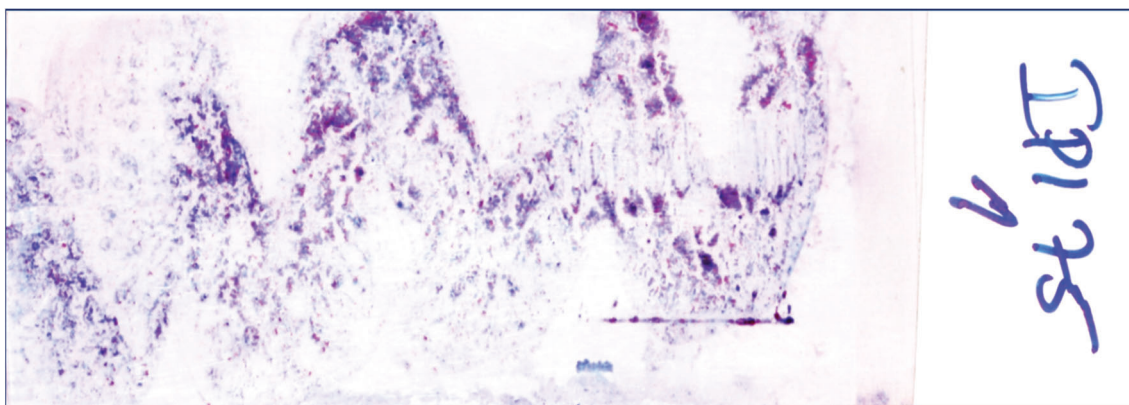
### 4.3. Estudio citológico

#### 4.3.1. Análisis general

Hemos analizado un total de 223 extendidos citológicos, 81 del GCO y 142 del GCA. En el GCA, 80 extendidos se recogieron en el tejido peri-implantario de implantes diagnosticados de PI y 62 de implantes sin PI.

##### 4.3.1.1. Cantidad de material

Se ha obtenido material citológico de todas las tomas realizadas. La cantidad de material obtenido por el raspado ha sido abundante en la mayor parte de los casos, tanto en el análisis general (n: 141; 63,20%), como en análisis por subgrupos (GCA con PI n: 58, 72,50%; GCA sin PI n: 34, 54,80%; GCO n: 49, 60,50%) (**Figura 18**) (**Tabla 9**).



**Figura 18.** Extensión citológica de un caso de peri-implantitis con material abundante (Papanicolaou).

##### 4.3.1.2. Células epiteliales escamosas

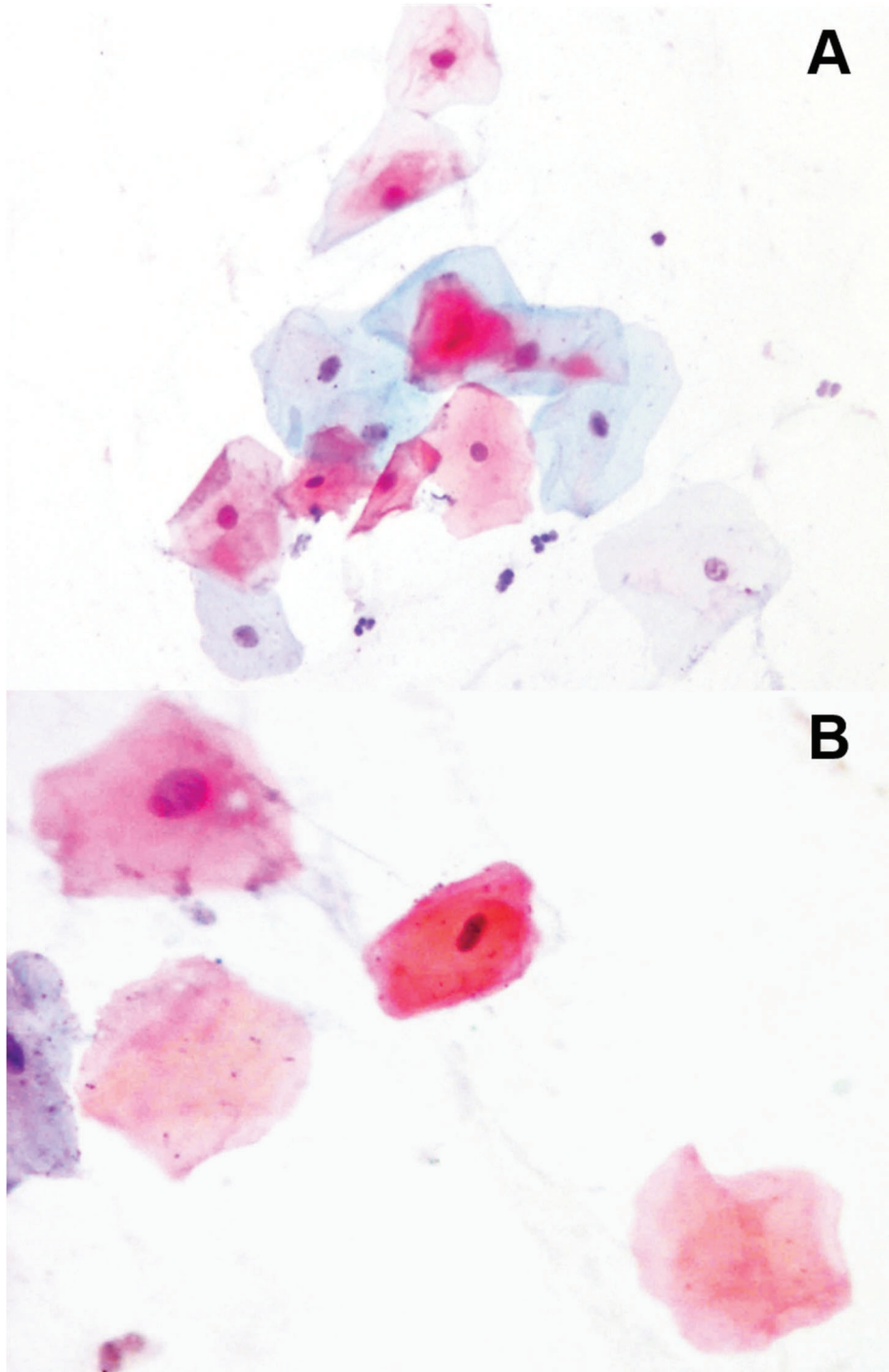
Hemos diferenciado las células epiteliales escamosas presentes en los extendidos en 2 categorías, células anucleadas (superficiales) y células nucleadas (intermedias). No hemos observado la presencia de células compatibles con células basales o parabasales.

Hemos identificado células epiteliales nucleadas en 221 extendidos citológicos (99,10%), siendo abundante en 122 (54,70%). En el análisis por grupos, la mayoría de los extendidos del GCA presentaban abundantes células epiteliales nucleadas (n: 72; 90%); mientras que en el GCO (n: 57; 70,40%) y en las muestras sin PI del GCA (n: 34; 54,80%) fueron escasas (**Tabla 9**) (**Figura 19**).

Los extendidos citológicos han presentado células epiteliales anucleadas en la mayoría de los casos (n: 205; 91%); siendo la cantidad, por lo general, escasa (n: 138; 61,90%). En los extendidos del GCA con PI la cantidad era abundante (n: 44; 55%); y en los del GCO (n: 58; 71,60%) y en los del GCA sin PI (n: 46; 74,20%) fue más escaso (**Tabla 9**) (**Figura 19**).

Las extensiones citológicas de los implantes del GCA con PI presentaron significativamente un mayor número de células epiteliales escamosas nucleadas ( $p < 0,01$ ) y anucleadas ( $p < 0,01$ ) (**Tabla 9**).





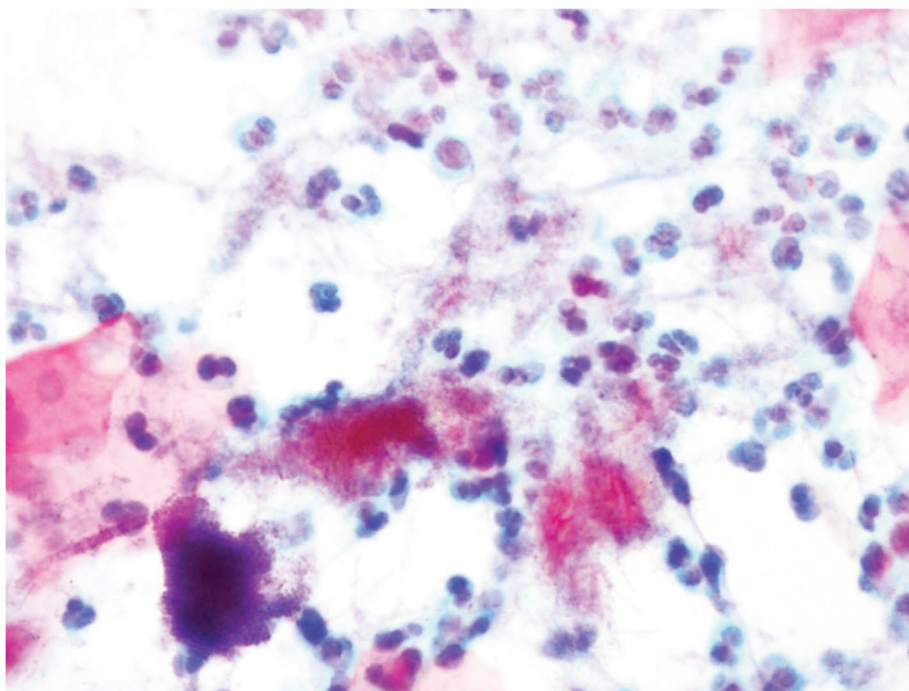
**Figura 19.** Extensión citológica. **A)** Células epiteliales escamosas nucleadas (naranjas y verde-azuladas). **B)** Células epiteliales escamosas nucleadas y anucleadas (naranjas y rosáceas) (Papanicolaou 10x).



#### 4.3.1.2. Detritus

La presencia de material de detritus, en forma de residuos generalmente sólidos, que provienen de la descomposición y aglomerado de elementos bucales, ha sido el segundo elemento citológico más identificado en los extendidos (n: 205; 92,80%), y fue en muchos casos abundante (n: 105; 47,10%).

En los casos del GCA con PI, una mayoría presentaron detritus abundantes (n: 55; 68,80%); al contrario que los del GCO (n: 44; 54,30%) y los del GCA sin PI (n: 33; 53,20%), donde además fue escaso. Estas diferencias respecto de la presencia de abundante detritus en los extendidos del GCA con PI fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) (**Figura 20**) (**Tabla 9**).



**Figura 20.** Extensión citológica. Material detritus sólido (morado, rojo), junto a células escamosas (naranjas) y células inflamatorias (azules) (Papanicolaou 10x).

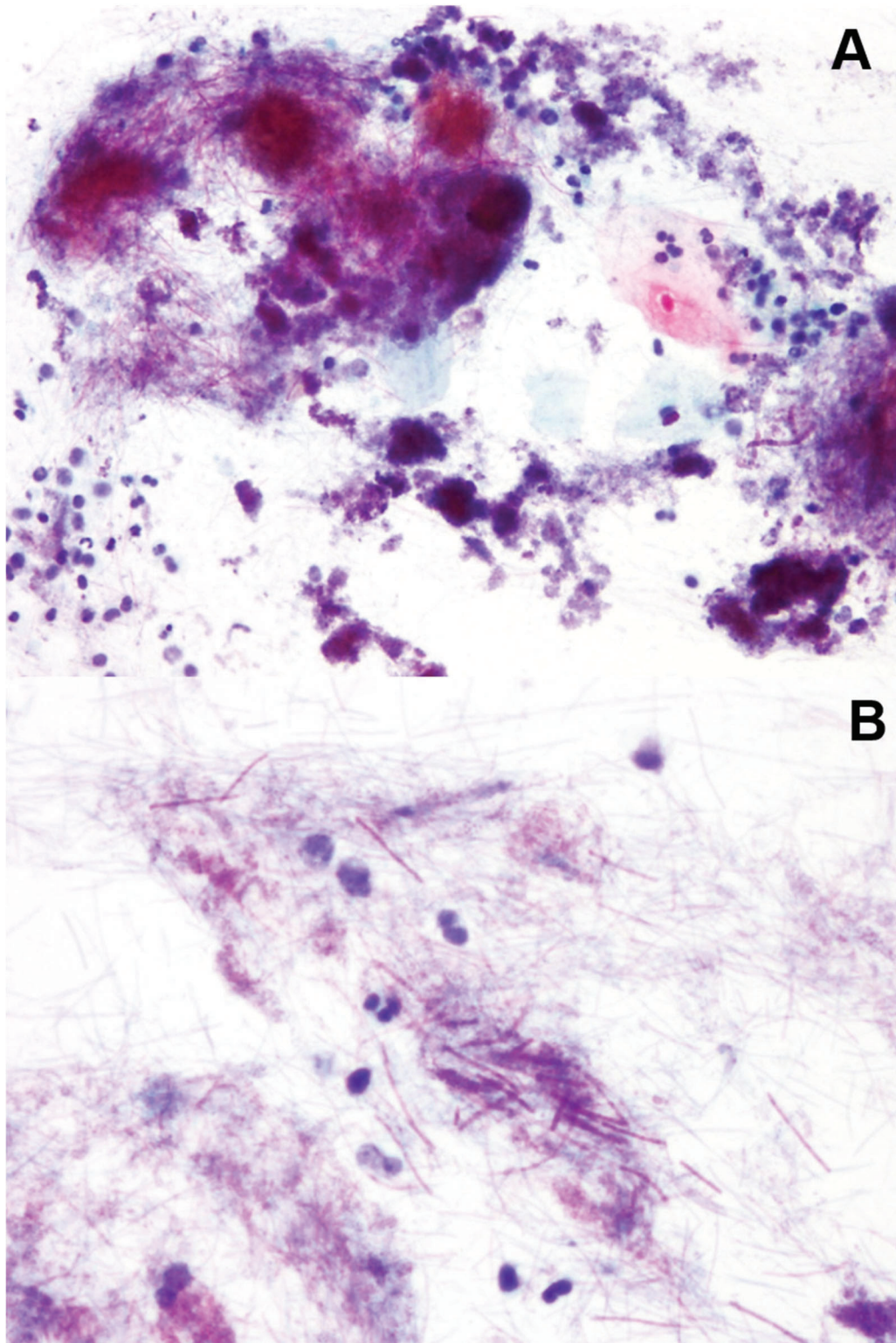
#### 4.3.1.3. Microbiota

En los extendidos citológicos hemos observado acumulaciones microbianas cocáceas y bacilares en el 88,30% (n: 197) de los casos, siendo la cantidad presente mayoritariamente abundante (n: 115; 51,60%). La cantidad microbiana fue abundante en las muestras del GCA con PI (n: 54; 67,50%) y escasa en las del GCO (n: 31; 38,30%) al igual que en las extensiones de los implantes sanos del GCA sin PI (n: 31; 50%) (**Figura 21**).

Las extensiones citológicas peri-implantarias de los casos con PI presentaron significativamente una mayor cantidad de microbiota (cocos y bacilos) ( $p < 0,01$ ) (**Tabla 9**).

En varias extensiones citológicas se han identificado formaciones microbianas complejas, en su mayoría tipo “mazorcas”, que han sido más frecuentes y abundantes en los casos del GCA con PI (n: 33; 11,30%) ( $p < 0,01$ ) (**Figura 12**) (**Tabla 9**).

Hemos observado la presencia de células epiteliales colonizadas por microbios en el 79,80% (n: 178) de las preparaciones citológicas, siendo abundante en 91 (40,80%). Esta colonización epitelial microbiana fue abundante en 47 (58,70%) extendidos de los casos con PI, y escaso en los del GCO (n: 35; 43,20%) y en los del GCA sin PI (n: 27; 43,50%). Las preparaciones citológicas peri-implantarias de los casos con PI presentaron una mayor cantidad significativa de células epiteliales colonizadas por microbios ( $p < 0,01$ ) (**Tabla 9**).



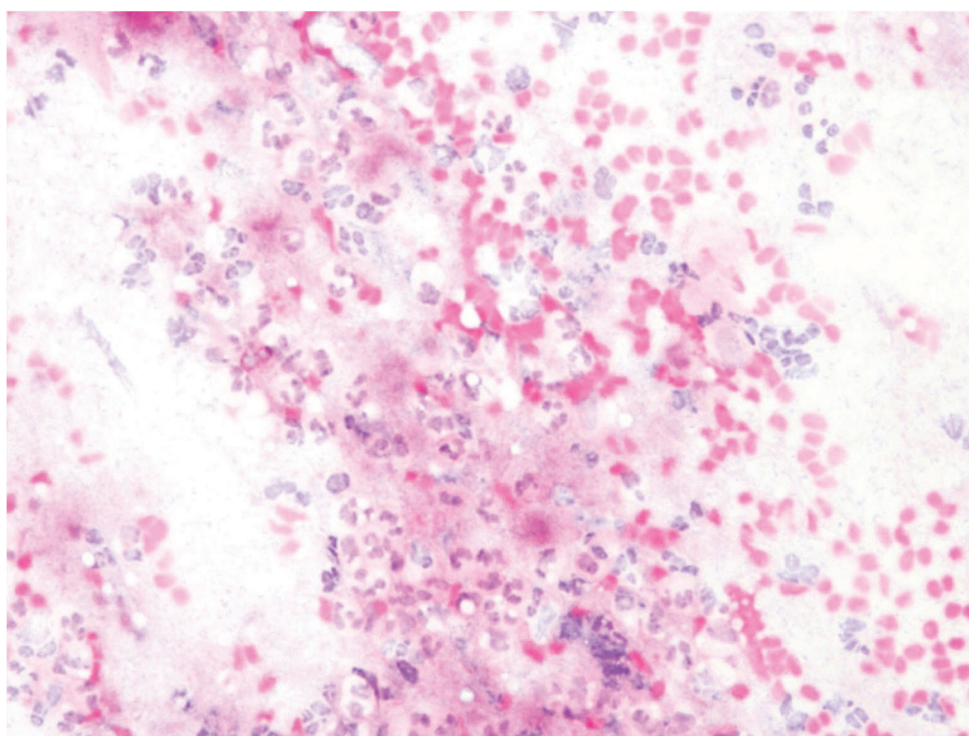
**Figura 21.** Extensión citológica. **A)** Colonización microbiana (morado) con formas cocáceas y bacilares, junto a células inflamatorias (azules), células escamosas (rosa) y detritus (rojo-naranja) (Papanicolaou 4x). **B)** Detalle de la colonización microbiana con cocos, bacilos y mazorcas (morado), junto a detritus (rojo-naranja) y células inflamatorias (azul) (Papanicolaou 10x).



#### 4.3.1.4. Hematíes

Sólo hemos observado hematíes en 40 extendidos citológicos (17,90%). En los casos del GCA con PI aparecieron hematíes abundantes en 14 extendidos (17,50%); en el GCO y en el GCA sin PI fue escaso en 5 (6,20%) y en 2 (3,2%), respectivamente (**Figura 22**).

Las extensiones citológicas peri-implantarias de los casos con PI presentaron significativamente más hematíes ( $p=0,01$ ) (**Tabla 9**).



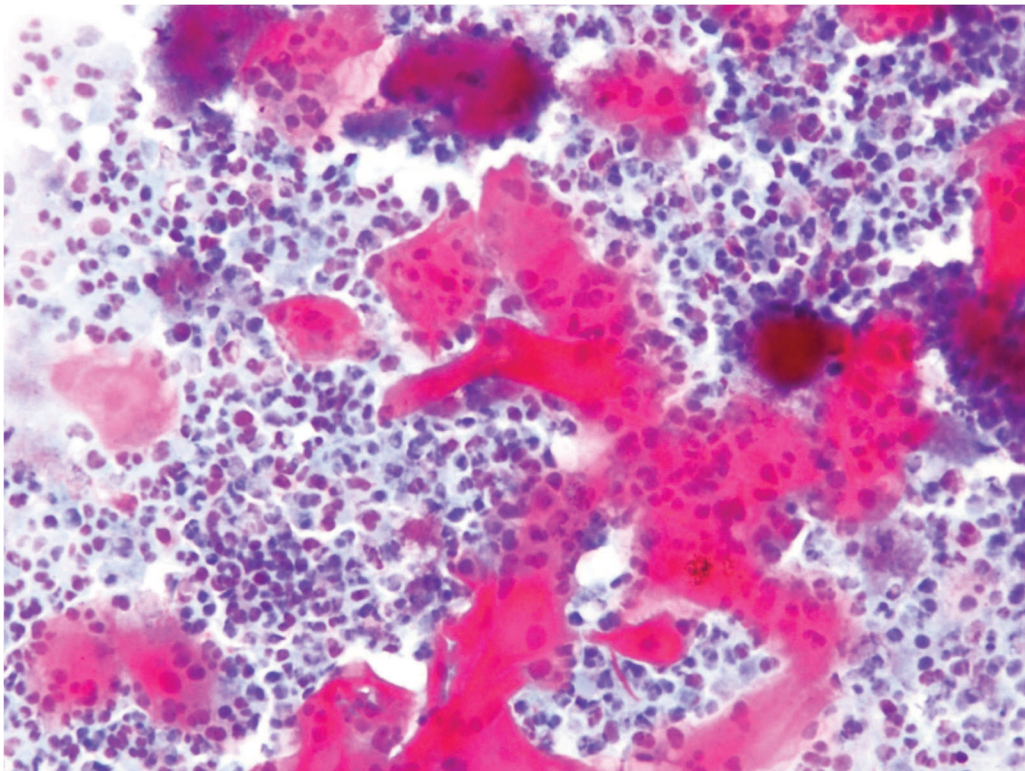
**Figura 22.** Extensión citológica. Hematíes (rojo), junto a células inflamatorias agudas polimorfonucleares (azul-rosa) (Papanicolaou 4x).

#### 4.3.1.5. Células inflamatorias

Se han identificado células inflamatorias agudas y crónicas en la mayoría de preparaciones citológicas estudiadas (n: 192; 86,10%); siendo más frecuente en las muestras con diagnóstico de PI (n: 73; 91,30%), que en las del GCO (n: 67; 82,70%) y en las del GCA sin PI (n: 45; 72,60%) (**Figuras 22-23**).

En las extensiones citológicas de los casos del GCA con PI, la cantidad de PMNs fue abundante (n: 41; 51,30%), y mayor a la de linfocitos, que eran escasos (n: 41; 51,30%). En las extensiones del GCO, la cantidad de linfocitos ha sido escasa (n: 35; 43,20%), y mayor que la de PMNs, que eran escasos (n: 26; 32,10%). En las extensiones de los casos del GCA sin PI la cantidad de linfocitos fue escasa (n: 27; 43,50%), y mayor que la de PMNs, que eran escasos (n: 15; 24,20%).

Hemos observado una mayor cantidad significativa de PMNs en las preparaciones de los casos con PI ( $p < 0,01$ ).



**Figura 23.** Extensión citológica. Células inflamatorias agudas polimorfonucleares (azul-rosa) y crónicas linfocitos (azul), junto a detritus (rojo) y células epiteliales escamosas (rosa-naranja) (Papanicolaou 10x).

**Tabla 9.** Variables citológicas: Análisis comparativo general por grupos.

Grupo de estudio	Variable citológica. Presencia: n (%)			p
	Ausente	Escaso	Abundante	
<b>Cantidad de material</b>				
GCO	0 (0)	32 (39,50)	49 (60,50)	0,08
GCA sin PI	0 (0)	28 (45,20)	34 (54,80)	
GCA con PI	0 (0)	22 (27,50)	58 (72,50)	
<b>Células epiteliales nucleadas</b>				
GCO	0 (0)	57 (70,40)	24 (29,60)	<0,01
GCA sin PI	2 (3,20)	34 (54,80)	26 (41,90)	
GCA con PI	0 (0)	8 (10)	72 (90)	
<b>Células epiteliales anucleadas</b>				
GCO	6 (7,4)	58 (71,60)	17 (21)	<0,01
GCA sin PI	10 (16,10)	46 (74,20)	6 (9,7)	
GCA con PI	2 (2,50)	34 (42,50)	44 (55)	
<b>Detritus</b>				
GCO	10 (12,30)	44 (54,30)	27 (33,30)	<0,01
GCA sin PI	6 (9,70)	33 (53,20)	23 (37,10)	
GCA con PI	2 (2,50)	23 (28,80)	55 (68,80)	
<b>Microbiota simple: Cocos/ bacilos</b>				
GCO	9 (11,10)	31 (38,30)	41 (50,60)	<0,01
GCA sin PI	11 (17,70)	31 (50)	20 (32,30)	
GCA con PI	6 (7,50)	20 (25)	54 (67,50)	
<b>Microbiota compleja</b>				
GCO	81 (100)	0 (0)	0 (0)	<0,01
GCA sin PI	57 (91,90)	5 (8,10)	0 (0)	
GCA con PI	47 (58,80)	24 (30)	9 (11,30)	
<b>Microbiota: Células epiteliales colonizadas</b>				
GCO	22 (27,20)	35 (43,20)	24 (29,60)	<0,01
GCA sin PI	15 (24,20)	27 (43,50)	20 (32,30)	
GCA con PI	8 (10)	25 (31,30)	47 (58,70)	
<b>Hematíes</b>				
GCO	72 (88,90)	5 (6,20)	4 (4,90)	0,01
GCA sin PI	55 (88,70)	2 (3,20)	5 (8,10)	
GCA con PI	56 (70)	10 (12,50)	14 (17,50)	
<b>Células inflamatorias: Polimorfonucleares</b>				
GCO	35 (43,20)	26 (32,10)	20 (24,70)	<0,01
GCA sin PI	34 (54,80)	15 (24,20)	13 (21)	
GCA con PI	10 (12,50)	29 (36,30)	41 (51,30)	
<b>Células inflamatorias: Linfocitos</b>				
GCO	15 (18,50)	35 (43,20)	31 (38,30)	0,15
GCA sin PI	19 (30,60)	27 (43,50)	16 (25,80)	
GCA con PI	21 (26,30)	41 (51,30)	18 (22,50)	

### **4.3.2. Análisis citológico y datos clínicos**

No hemos reconocido ninguna asociación entre los datos generales de los pacientes (género, edad, consumo de tabaco, consumo de alcohol, antecedentes médicos) y las diferentes variables citológicas estudiadas.

En relación con los datos clínicos, hemos reconocido una fuerte relación entre la presencia de formas microbiana complejas y la PS  $\geq 5$  mm ( $p=0,05$ ) y la POM  $\geq 5$  mm ( $p=0,008$ ) (**Tablas 10-11**), en los casos diagnosticados de PI.

**Tabla 10.** Variables citológicas: Análisis del GCA con PI y los datos clínicos: PS.

Dato periodontal		Variable citológica. Presencia: n (%)			p
		Ausente	Escaso	Abundante	
<b>Cantidad de material</b>					
PS	< 5 mm	7 (30,40)	12 (52,20)	4 (17,40)	0,77
	≥ 5 mm	15 (26,30)	28 (49,10)	14 (24,60)	
<b>Células epiteliales nucleadas</b>					
PS	< 5 mm	0 (0)	10 (43,40)	13 (56,60)	0,48
	≥ 5 mm	0 (0)	26 (43,90)	32 (56,10)	
<b>Células epiteliales anucleadas</b>					
PS	< 5 mm	0 (0)	22 (95,60)	1 (4,40)	0,65
	≥ 5 mm	2 (3,50)	53 (93)	2 (3,50)	
<b>Detritus</b>					
PS	< 5 mm	0 (0)	21 (91,30)	2 (8,70)	0,29
	≥ 5 mm	2 (3,50)	44 (77,20)	11 (19,30)	
<b>Microbiota simple: Cocos / bacilos</b>					
PS	< 5 mm	1 (4,30)	14 (60,90)	8 (34,80)	0,60
	≥ 5 mm	5 (8,80)	35 (61,60)	17 (29,60)	
<b>Microbiota compleja</b>					
PS	< 5 mm	12 (52,20)	9 (39,10)	2 (8,70)	<b>0,05</b>
	≥ 5 mm	35 (61,40)	15 (26,30)	7 (12,30)	
<b>Microbiota: Células epiteliales colonizadas</b>					
PS	< 5 mm	0 (0)	22 (95,70)	1 (4,30)	0,06
	≥ 5 mm	8 (14)	44 (77,20)	5 (8,80)	
<b>Hematies</b>					
PS	< 5 mm	18 (78,30)	3 (13)	2 (8,70)	0,71
	≥ 5 mm	38 (66,70)	10 (17,50)	9 (15,80)	
<b>Células inflamatorias: Polimorfonucleares</b>					
PS	< 5 mm	4 (17,40)	14 (60,90)	5 (21,70)	0,88
	≥ 5 mm	6 (10,50)	37 (64,90)	14 (24,60)	
<b>Células inflamatorias: Linfocitos</b>					
PS	< 5 mm	3 (13)	20 (87)	0 (0)	0,15
	≥ 5 mm	18 (31,60)	38 (66,70)	1 (1,70)	



**Tabla 11.** Variables citológicas. Análisis del GCA con PI y los datos clínicos: POM.

Dato periodontal		Variable citológica. Presencia: n (%)			p
		Ausente	Escaso	Abundante	
<b>Cantidad de material</b>					
POM	< 5 mm	2 (16,70)	8 (66,70)	2 (16,70)	0,44
	≥ 5 mm	20 (29,40)	32 (47,10)	16 (23,50)	
<b>Células epiteliales nucleadas</b>					
POM	< 5 mm	0 (0)	6 (50)	6 (50)	0,73
	≥ 5 mm	0 (0)	29 (42,60)	39 (57,40)	
<b>Células epiteliales anucleadas</b>					
POM	< 5 mm	1 (8,30)	11 (91,70)	0 (0)	0,43
	≥ 5 mm	1 (1,50)	64 (94,10)	3 (4,40)	
<b>Detritus</b>					
POM	< 5 mm	0 (0)	12 (100)	0 (0)	0,14
	≥ 5 mm	2 (2,90)	54 (77,90)	13 (19,10)	
<b>Microbiota simple: Cocos / bacilos</b>					
POM	< 5 mm	1 (8,30)	6 (50)	5 (41,70)	0,82
	≥ 5 mm	5 (7,40)	43 (63,30)	20 (29,40)	
<b>Microbiota compleja</b>					
POM	< 5 mm	4 (33,33)	8 (66,70)	0 (0)	<b>0,01</b>
	≥ 5 mm	43 (63,20)	16 (23,50)	9 (13,20)	
<b>Microbiota: Células epiteliales colonizadas</b>					
POM	< 5 mm	1 (8,30)	9 (75)	2 (16,70)	0,69
	≥ 5 mm	7 (10,30)	57 (83,90)	4 (5,90)	
<b>Hematies</b>					
POM	< 5 mm	10 (83,30)	1 (8,30)	1 (8,30)	0,60
	≥ 5 mm	46 (67,60)	12 (17,60)	10 (14,70)	
<b>Células inflamatorias: Polimorfonucleares</b>					
POM	< 5 mm	3 (25)	8 (66,70)	1 (8,30)	0,34
	≥ 5 mm	7 (10,30)	43 (63,20)	18 (26,50)	
<b>Células inflamatorias: Linfocitos</b>					
POM	< 5 mm	5 (41,70)	7 (58,30)	0 (0)	0,21
	≥ 5 mm	16 (23,50)	51 (75)	1 (1,50)	

### 4.3.3. Análisis de especificidad y sensibilidad

Las tasas de sensibilidad y especificidad de la técnica de citología exfoliativa por raspado como método diagnóstico para la PI se muestran en la **Tabla 12**.

Las variables citológicas con el mayor grado de sensibilidad, especificidad y AUC fueron las células epiteliales anucleadas (Sensibilidad: 73,50%; Especificidad: 81,90%; AUC: 74), las células epiteliales nucleadas (Sensibilidad: 88%; Especificidad: 60,90%; AUC: 72,70%) y las células inflamatorias PMNs (Sensibilidad: 71,40%; Especificidad: 77,30%; AUC: 71,20%).

La sensibilidad media de los principales parámetros citológicos analizados fue de 77,63% y la especificidad media de 73,33%.

**Tabla 12.** Variables citológicas. Análisis de sensibilidad y especificidad.

<b>Variable citológica</b>	<b>Sensibilidad (%)</b>	<b>Especificidad (%)</b>	<b>AUC (%)</b>
Detritus	70,5	60,9	65,8
Células epiteliales nucleadas	73,5	81,8	74
Células epiteliales anucleadas	88	60,9	72,7
Microbiota simple	73	61,8	67,6
Microbiota compleja	86,8	54,8	55,6
Células epiteliales colonizadas	70,1	56	63,2
Células inflamatorias: PMNs	71,4	77,3	71,2
Células inflamatorias: Linfocitos	57,8	47,5	52,2
Hematíes	77,4	49,5	59,4

## 4.4. Estudio micológico

### 4.4.1. Análisis general

#### 4.4.1.1. Muestra de enjuague oral

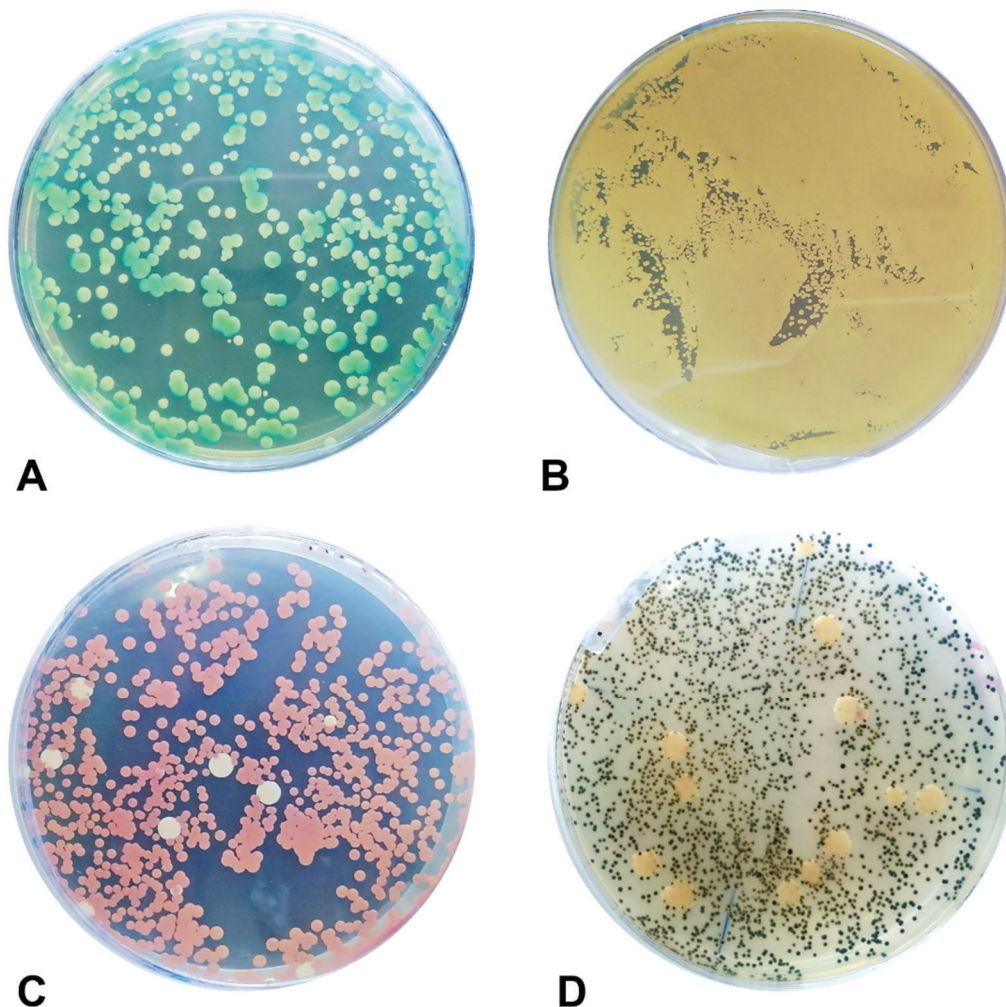
Hemos procesado 161 enjuagues orales para el estudio micológico, 80 en el GCA y 81 en el GCO.

Se constató crecimiento fúngico en 45 muestras (27,95%): 20 en el GCA (25%) y 25 (30,90%) en el GCO ( $p=0,48$ ). El 68,89% de los cultivos ( $n: 31$ ) mostraron un crecimiento de más de 50 UFC, compatibles con infección candidósica activa, el 70% del GCA ( $n: 14$ ) y el 60% del GCO ( $n: 15$ ) ( $p=0,54$ ) (**Tabla 13**). No obstante, ningún paciente mostraba datos clínicos de candidiasis oral en el momento en el que se realizó la toma micológica.

El 84,40% de los cultivos obtenidos ( $n: 38$ ) fueron simples, de un solo microorganismo; siendo mayor en el GCO ( $n: 23$ ; 92%) que en el GCA ( $n: 15$ ; 75%) ( $p=0,21$ ). Tras la identificación fúngica final, las especies más frecuentemente aisladas en los cultivos del GCA fueron: *C. parapsilosis* ( $n: 8$ ; 40%), *C. guilliermondi* ( $n: 5$ ; 25%), *C. albicans* ( $n: 4$ ; 20%) y *C. lipolytica* ( $n: 3$ ; 12%) (**Figuras 24-25**) (**Tabla 13**). En los cultivos del GCO, la especie más aislada fue *C. albicans* ( $n: 7$ ; 28%), *C. parapsilosis* ( $n: 4$ ; 17,40%), *C. glabrata* ( $n: 3$ ; 12%), *C. zeylanoides* ( $n: 3$ ; 12%), *C. guilliermondi* ( $n: 2$ ; 8%), *C. lipolytica* ( $n: 2$ ; 8%), *C. krusei* ( $n: 1$ ; 4%), *C. lipolytica* ( $n: 1$ ; 4%), *C. pelliculosa* ( $n: 1$ ; 4%), *C. famata* ( $n: 1$ ; 4%) y *C. incons. norvengen* ( $n: 1$ ; 4%) (**Figuras 24-25**). De modo anecdótico, también hemos reconocido otras formas fúngicas no candidósicas (*Debaryomyces etch. carso*, *Debaryomyces polymorphus* y *Geotrichum spp.*) (**Tabla 13**).

El 15,56% de los cultivos (n: 7) fue mixto, con más de un microorganismo; siendo esta cifra mayor en el GCA (n: 5; 25%) que en el GCO (n: 2; 8%) (Tabla 13). Estos cultivos fueron *C. parapsilosis* + *C. guillermondi*, *C. parapsilosis* + *Rhodomyces mucilaginosa*, *C. parapsilosis* + *C. famata*, *C. parapsilosis* + *Debaryomyces etch. carso* y *C. lipolytica* + *C. albicans* en el GCA; y *Zigossachis* + *C. albicans* y *C. zeylanoides* + *C. lipolytica* en el GCO (Figuras 24-25).

No hemos reconocido diferencias significativas entre los grupos de estudio en relación con las especies de *Candida* reconocidas tras el cultivo del enjuague oral (Tabla 13).



**Figura 24.** Cultivos simples y mixtos de *Candida spp.* en muestras de enjuague oral. Placas de *Candida* Chromogenic Agar/ CONDA. **A)** UFCs verdes de *C. albicans*. **B)** UFCs pardo-blancas de *C. parapsilosis*. **C)** UFCs rojas de *Rhodomyces mucilaginosa* y UFC blancas de *C. parapsilosis*. **D)** UFCs blancas de *C. lipolytica* y UFC verdes de *C. albicans*.

#### 4.4.1.2. Muestra de puntas de fluido crevicular peri-implantario

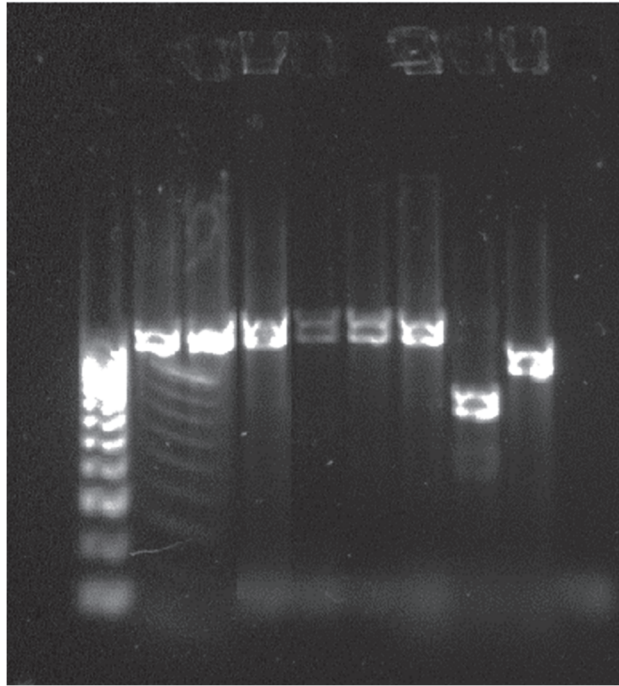
Tras el análisis micológico de los enjuagues, hemos estudiado 354 muestras tomadas con puntas de papel del surco peri-implantario: 146 en el GCO y 208 en el GCA. En el GCO, 81 muestras eran del fluido peri-implantario de un implante sano y 65 del fluido crevicular dental. En el GCA, 80 muestras eran del fluido peri-implantario de implantes con PI, 63 de implantes sin PI y 65 del fluido crevicular dental (**Tabla 14**).

En el GCA, se aisló *Candida spp.* en el fluido crevicular dental de 1 caso (1,50%) y del fluido peri-implantario de 11 implantes (7,70%): 8 con PI (10%) y 3 sin PI (6,80%) ( $p=0,10$ ). Todos los cultivos fueron simples y correspondían a *C. albicans* (n: 3; 37,50%), *C. parapsilosis* (n: 2; 25%), *C. lipolytica* (n: 2; 25%) y *C. glabrata* (n: 1; 12,50%) en los implantes con PI; a *C. parapsilosis* (n: 2; 66,70%) y *C. glabrata* (n: 1; 33,30%) en los implantes sin PI; y a *C. parapsilosis* en los dientes. La mayoría de los cultivos peri-implantarios mostraron un crecimiento fúngico  $> 50$  UFC (**Figuras 25-26**) (**Tabla 14**).

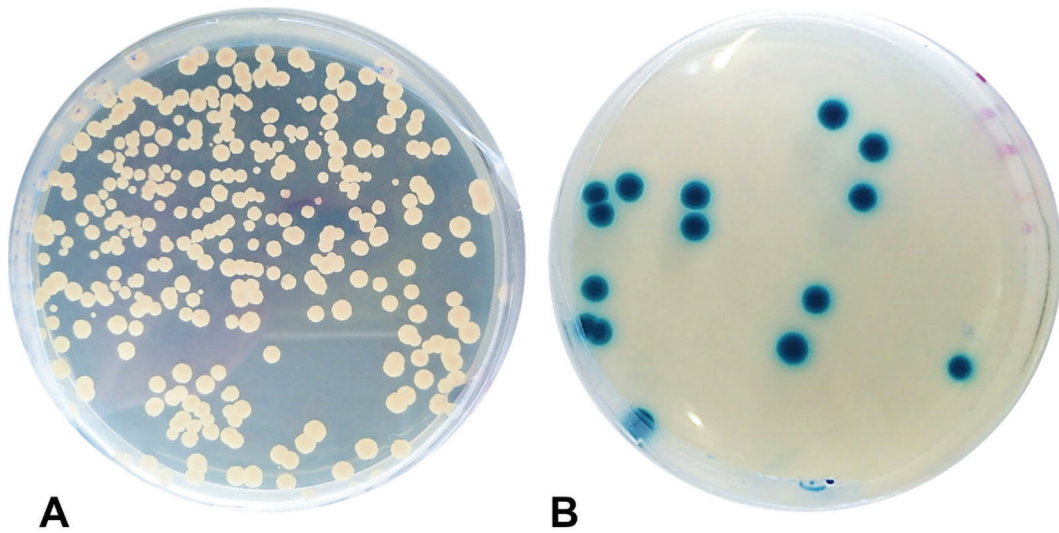
En el GCO se aisló *Candida spp.* en el fluido crevicular de 2 dientes (3,10%) y de 3 implantes (3,70%) ( $p=0,84$ ). Todos los cultivos fueron simples y correspondieron a *C. glabrata* (n: 1; 33,33%), *C. pelliculosa* (n: 1; 33,33%) y *C. holmi* (n: 1; 33,33%) en los implantes, y a *C. holmi* (n: 22; 50%) y *C. glabrata* (n: 22; 50%) en los dientes (**Figuras 25-26**). Sólo un cultivo de los implantes mostró  $> 50$  UFC (**Figuras 25-26**) (**Tabla 14**).

No se han reconocido diferencias en las especies de *Candida* entre ambos grupos de estudio. Tampoco hemos observado diferencias en la presencia de *Candida spp.* entre las muestras dentales y peri-implantarias ( $p=0,18$ ) (**Tabla 14**).

No se ha visto relación entre la presencia de *Candida* en las muestras de fluido peri-implantario y enjuague oral.



**Figura 25.** qPCR. Identificación final de *C. albicans* en el transiluminador, con los controles positivos y negativos (*C. dubliniensis* y *C. africana*).



**Figura 26.** Cultivo de *Candida spp.* en muestras de fluido peri-implantario. Placas de *Candida* Chromogenic Agar/ CONDA. **A)** UFCs pardo-blancas de *C. parapsilosis*. **B)** UFCs verdes de *C. albicans*.



**Tabla 13.** Identificación fúngica presuntiva y final de las muestras de enjuague oral: análisis comparativo por grupos.

Dato micológico	Grupo de estudio			p
	GCA: n (%)	GCO: n (%)	Total: n (%)	
Crecimiento (+) (-)	20 (25) 60 (75)	25 (30,90) 56 (69,10)	45 (28) 116 (72)	0,48
Cultivo Simple Mixto	15 (75) 5 (25)	23 (92) 2 (8)	38 (84,40) 7 (15,60)	0,21
UFC > 50 < 50	14 (70) 6 (30)	15 (60) 8 (40)	31 (68,90) 14 (31,10)	0,54
Especies <i>Candida</i> <i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. guilliermondi</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. pelliculosa</i> <i>C. incons. norvengen</i> <i>C. famata</i>	4 (20) 8 (40) 5 (25) 3 (12) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	7 (28) 4 (17,40) 2 (8) 2 (8) 3 (12) 3 (12) 1 (4) 1 (4) 1 (4) 1 (4) 1 (4)	11 (24,40) 12 (26,70) 7 (15,60) 5 (11,10) 3 (6,70) 3 (6,70) 1 (2,20) 1 (2,20) 1 (2,20) 1 (2,20) 1 (2,20)	>0,05
Otras especies fúngicas <i>Debaryomyces etch. carso</i> <i>Geotrichum spp.</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>	1 (6,70) 1 (6,70) 0 (0)	1 (4) 0 (0) 1 (4)	2 1 1	>0,05



**Tabla 14.** Identificación fúngica presuntiva y final de las muestras de fluido peri-implantario y crevicular: análisis comparativo por grupos.

Dato micológico	Grupo de estudio					Total: n (%)	p
	GCA: n (%)			GCO: n (%)			
	PI	Sano	Diente	Sano	Diente		
Crecimiento (+)	8 (10)	3 (6,80)	1 (1,50)	3 (3,70)	2 (3,10)	17 (4,80)	0,84
(-)	62 (90)	60 (95,20)	64 (98,50)	68 (66,30)	63 (66,90)		
UFC							
> 50	7 (87,50)	2 (66,70)	0 (0)	1 (3,30)	0 (0)	10 (58,90)	>0,05
< 50	1 (12,50)	1 (33,30)	1 (100)	2 (66,70)	2 (100)	7 (42,10)	
Especies <i>Candida</i>							
<i>C. albicans</i>	3 (37,50)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (17,60)	0,18
<i>C. parapsilosis</i>	2 (25)	2 (66,70)	1 (100)	0 (0)	0 (0)	5 (29,40)	
<i>C. lipolytica</i>	2 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (11,80)	
<i>C. glabrata</i>	1 (12,50)	1 (33,30)	0 (0)	1 (33,33)	1 (50)	3 (17,60)	
<i>C. pelliculosa</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33,33)	0 (0)	1 (5,90)	
<i>C. holmii</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (33,33)	1 (50)	1 (5,90)	

#### 4.4.2. Análisis micológico, datos clínicos y datos citológicos

No hemos reconocido ninguna asociación entre los datos generales de los pacientes (género, edad, consumo de tabaco, consumo de alcohol, antecedentes médicos) y los resultados micológicos obtenidos.

En cuanto a los datos clínicos, hemos observado una asociación estadísticamente significativa en el GCO, entre la presencia de *Candida spp.* en las muestras de enjuague oral y los pacientes edéntulos ( $p=0,04$ ), los portadores de prótesis híbridas ( $p=0,03$ ) y los portadores de prótesis sobredentaduras ( $p=0,05$ ) (**Tabla 15**).

En las muestras obtenidas del fluido peri-implantario en los casos del GCA sin PI, hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre el crecimiento de *Candida spp.* y la presencia de detritus ( $p=0,02$ ) y de linfocitos ( $p=0,04$ ) en los extendidos citológicos (**Tabla 16**). En las muestras obtenidas del fluido peri-implantario en los casos del GCA con PI, hemos observado una asociación estadísticamente significativa entre el crecimiento de *Candida spp.* y la presencia de detritus ( $p=0,05$ ) y de linfocitos en los extendidos citológicos ( $p=0,05$ ) (**Tabla 16**). No hemos sido capaces de reconocer una relación entre la identificación de formas levaduriformes en las extensiones citológicas de la mucosa peri-implantaria y la presencia de *Candida spp.* en las muestras de enjuague ni de puntas de papel.

**Tabla 15.** Variables micrológicas. Análisis de las muestras de enjuague oral y los datos clínicos.

Datos clínico		GCO		p	GCA		p
		Variable micrológica: n (%)			Variable micrológica: n (%)		
		Colonización			Colonización		
		(+)	(-)		(+)	(-)	
Edentulismo total	No	18 (72)	52 (92,90)	0,04	52 (86,60)	70 (86,40)	0,72
	Si	7 (28)	4 (7,10)		8 (13,30)	11 (13,60)	
Prótesis coronas y puentes	No	22 (88)	53 (94,60)	0,29	18 (90)	57 (95)	0,79
	Si	3 (12)	3 (5,40)		2 (10)	3 (5)	
Prótesis sobredentaduras	No	22 (88)	55 (98,20)	0,05	20 (100)	80 (100)	-
	Si	3 (12)	1 (1,80)		0 (0)	0 (0)	
Prótesis híbrida	No	18 (72)	51 (91,10)	0,03	16 (80)	48 (80)	0,64
	Si	7 (28)	5 (8,90)		4 (20)	12 (20)	

**Tabla 16.** Variables micológicas. Análisis de las muestras de puntas de papel del fluido peri-implantario, los datos clínicos y los datos citológicos.

Grupo de estudio	Datos citológicos	Variable micológica: n (%)		p	
		Colonización			
		(+)	(-)		
GCO	Detritus	No	2 (66,70)	8 (10,30)	0,58
		Si	1 (33,30)	70 (89,70)	
GCA sin PI	Detritus	No	0 (0)	9 (15)	<b>0,02</b>
		Si	3 (100)	51 (85)	
GCA con PI	Detritus	No	2 (28,60)	22 (30,10)	<b>0,05</b>
		Si	5 (71,40)	51 (69,90)	
GCO	Células epiteliales nucleadas	No	0 (0)	0 (0)	0,43
		Si	3 (100)	78 (100)	
GCA sin PI	Células epiteliales nucleadas	No	0 (0)	5 (8,30)	0,12
		Si	3 (100)	55 (91,70)	
GCA con PI	Células epiteliales nucleadas	No	2 (28,60)	18 (24,70)	0,96
		Si	5 (72,40)	55 (75,30)	
GCO	Células epiteliales anucleadas	No	0 (0)	6 (7,70)	0,20
		Si	3 (100)	72 (92,30)	
GCA sin PI	Células epiteliales anucleadas	No	0 (0)	13 (21,70)	0,33
		Si	3 (100)	47 (78,30)	
GCA con PI	Células epiteliales anucleadas	No	3 (42,90)	25 (34,20)	0,66
		Si	4 (58,10)	48 (65,70)	
GCO	Microbiota simple: Cocos/ bacilos	No	0 (0)	9 (11,50)	0,49
		Si	3 (100)	49 (88,50)	
GCA sin PI	Microbiota simple: Cocos/ bacilos	No	0 (0)	14 (23,30)	0,09
		Si	3 (100)	46 (76,60)	
GCA con PI	Microbiota simple: Cocos/ bacilos	No	3 (42,90)	26 (35,60)	0,11
		Si	4 (57,10)	47 (64,40)	
GCO	Microbiota compleja	No	3 (100)	78 (100)	-
		Si	0 (0)	0 (0)	
GCA sin PI	Microbiota compleja	No	3 (100)	55 (91,70)	0,78
		Si	0 (0)	5 (8,30)	
GCA con PI	Microbiota compleja	No	7 (100)	78 (93,20)	0,48
		Si	0 (0)	5 (6,80)	
GCO	Microbiota: Células epiteliales colonizadas	No	2 (66,70)	20 (25,60)	0,20
		Si	1 (33,30)	56 (74,40)	
GCA sin PI	Microbiota: Células epiteliales colonizadas	No	1 (33,30)	17 (28,30)	0,29
		Si	2 (66,70)	43 (71,70)	
GCA con PI	Microbiota: Células epiteliales colonizadas	No	4 (57,10)	29 (39,70)	0,20
		Si	3 (42,90)	44 (60,30)	
GCO	Hematíes	No	3 (100)	69 (88,50)	0,70
		Si	0 (0)	9 (11,50)	
GCA sin PI	Hematíes	No	2 (66,70)	54 (90)	0,40
		Si	1 (33,30)	6 (10)	
GCA con PI	Hematíes	No	6 (85,70)	67 (91,80)	0,61
		Si	1 (14,30)	6 (8,20)	
GCO	Células inflamatorias: PMNs	No	2 (66,70)	33 (42,30)	0,40
		Si	1 (33,30)	45 (57,70)	
GCA sin PI	Células inflamatorias: PMNs	No	3 (100)	33 (55)	0,18
		Si	0 (0)	27 (45)	
GCA con PI	Células inflamatorias: PMNs	No	6 (85,70)	46 (63)	0,20
		Si	1 (14,30)	27 (36)	
GCO	Células inflamatorias: Linfocitos	No	1 (33,30)	14 (17,90)	0,23
		Si	2 (66,70)	64 (82,10)	
GCA sin PI	Células inflamatorias: Linfocitos	No	3 (100)	19 (31,70)	<b>0,05</b>
		Si	0 (0)	41 (68,30)	
GCA con PI	Células inflamatorias: Linfocitos	No	6 (85,70)	31 (42,50)	<b>0,05</b>
		Si	1 (14,30)	42 (57,50)	

#### 4.5. Regresión logística binaria

En el análisis de regresión logística binaria hemos observado un incremento en el riesgo de desarrollo de PI en los pacientes con mayor tiempo de seguimiento (OR: 1,24; IC95%: 1,12-1,39;  $p<0,01$ ) y los fumadores de más de 10 cigarros al día (OR: 1,36; IC95%: 1,07-1,73;  $p=0,01$ ) (**Tabla 17**).

Ninguno de los SNPs estudiados aumentó, de manera significativa, el riesgo de desarrollo de PI (**Tabla 17**).

Asimismo, la presencia en los extendidos citológicos de detritus (OR: 4,44; IC95%: 2,27-8,52;  $p<0,01$ ), células epiteliales nucleadas (OR: 21,38; IC95%: 8,93-51,14;  $p<0,01$ ), células epiteliales anucleadas (OR: 4,60; CI95%: 2,30-9,20;  $p<0,01$ ), formaciones cocáceas y bacilares (OR: 2,03; CI95%: 1,07-3,84;  $p=0,03$ ), PMNs (OR: 3,21; CI95%: 1,64-6,26;  $p<0,01$ ), hematíes (OR: 4,08; CI95%: 1,28-13,01;  $p=0,02$ ) y células epiteliales colonizadas por gérmenes (OR: 3,38; CI95%: 1,76-6,50;  $p<0,01$ ) aumentaron de manera significativa el riesgo de PI. Por el contrario, la presencia de linfocitos constituyó un factor protector (OR: 0,40; CI95%: 0,20-0,82;  $p=0,01$ ) (**Tabla 18**).

No se pudo realizar el análisis de regresión en los datos obtenidos en el estudio micológico.

**Tabla 17.** Regresión logística binaria. Análisis clínico y genético.

<b>Dato clínico</b>		<b>OR (IC95%)</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC95%) ajustado</b>	<b>p</b>
Tiempo de seguimiento		<b>1,22 (1,04 - 1,36)</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>1,24 (1,12 - 1,39)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Tabaco > 10 cig/día		<b>1,35 (1,07 - 1,70)</b>	<b>0,01</b>	<b>1,36 (1,07 - 1,73)</b>	<b>0,01</b>
Prótesis puentes		1,78 (0,95 - 3,35)	0,07	1,85 (0,96 - 3,54)	0,07
<b>Gen-SNP</b>	<b>Genotipo</b>	<b>OR (IC95%)</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC95%) ajustado</b>	<b>p</b>
GBP1 rs7911	CC	1	-	1	-
	CT	0,46 (0,189 - 1,105)	0,08	0,51 (0,20 - 1,28)	0,15
	TT	1,07 (0,421 - 2,725)	0,89	1,30 (0,49 - 3,47)	0,80
BRINP3 rs1935881	GG	1	-	1	-
	AG	0,56 (0,186 - 1,661)	0,29	0,48 (0,15 - 1,47)	0,20
	AA	1,58 (0,527 - 4,720)	0,42	1,34 (0,45 - 4,30)	0,56

**Tabla 18.** Regresión logística multinomial. Análisis citológico (referencia: implantes del GCO)

Dato citológico	Grupo de estudio	OR (IC95%)	p
Detritus	Sano	0,81 (0,43 - 1,58)	0,53
	PI	<b>4,41 (2,27 - 8,52)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Células epiteliales nucleadas	Sano	1,14 (0,59 - 2,23)	0,69
	PI	<b>21,38 (8,93 - 51,14)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Células epiteliales anucleadas	Sano	0,31 (0,11 - 0,82)	0,02
	PI	<b>4,60 (2,30 - 9,20)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Microbiota simple: Cocos/ bacilos	Sano	0,33 (0,17 - 0,634)	<0,01
	PI	<b>2,03 (1,07 - 3,84)</b>	<b>0,03</b>
Microbiota: Células epiteliales colonizadas	Sano	0,79 (0,40 - 1,58)	0,51
	PI	<b>3,38 (1,76 - 6,50)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Hematíes	Sano	1,28 (0,33 - 4,96)	0,72
	PI	<b>4,08 (1,28 - 13,01)</b>	<b>0,02</b>
Células inflamatorias: PMNs	Sano	0,59 (0,27 - 1,29)	0,19
	PI	<b>3,21 (1,64 - 6,26)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Células inflamatorias: Linfocitos	Sano	<b>0,40 (0,20 - 0,82)</b>	<b>0,01</b>
	PI	<b>0,47 (0,24 - 0,93)</b>	<b>0,03</b>





## **5. DISCUSIÓN**

### **5.1. En relación con los aspectos epidemiológicos y clínicos**

Actualmente la peri-implantitis es uno de los trastornos orales con mayor relevancia en la cavidad oral, mostrando una prevalencia que oscila entre el 20% y el 50% de los pacientes con implantes dentales (Mombelli et al., 2012). Este porcentaje disminuye a nivel implantológico, afectando a alrededor del 20% de los implantes (Kordbacheh et al., 2019); una cifra similar a la obtenida en nuestro estudio (28,66%), así como a la reportada en población española (Rodrigo et al., 2018).

No hemos reconocido diferencias significativas en relación con el género o la edad de los pacientes con y sin diagnóstico de PI, como señalan la gran mayoría de los estudios (Tomasi et al., 2012; Dreyer et al., 2018; Schwarz et al., 2018).

El inicio de la enfermedad peri-implantaria suele producirse a partir de los 2-3 años tras la cirugía implantológica (Derks et al., 2016). En nuestro estudio, el tiempo medio transcurrido desde la colocación del implante hasta el diagnóstico clínico de la PI fue de  $4,61 \pm 2,50$  años, similar a lo expuesto en otros trabajos (Lindhe et al., 2008; Lang et al., 2011; Derks et al., 2016); lo que subraya la necesidad de que el control de los pacientes con implantes dentales sea de por vida.

El consumo de tabaco es un factor favorecedor de PI cuya verdadera implicación aún está por definir (Schwarz et al., 2018). No obstante, el hábito tabáquico se considera un claro inductor de la POM (Rinke et al., 2011), ya que de una manera directa inhibe la proliferación osteoblástica y angiogénica por la nicotina, y de manera indirecta suprime la absorción del calcio y la producción de PTH, de OPG y de vitamina D (Sgolastra et al., 2015). En nuestro estudio hemos podido reconocer una asociación significativa entre la

presencia de PI y el consumo de más de 10 cig/día ( $P=0,01$ ). El riesgo de aparición de PI fue 1,36 veces mayor en los pacientes fumadores. Sin embargo, existen trabajos donde no se ha reconocido esta relación (Aguirre-Zorzano et al., 2015; Dalago et al., 2017). Pensamos que estas diferencias podrían deberse a la falta de homogeneidad a la hora de definir a los pacientes consumidores de tabaco y a la cantidad de tabaco consumido. En nuestro análisis, al igual que en otros estudios (de Araujo Nobre et al., 2014; Derks et al., 2016) el consumo de tabaco constituyó un factor de riesgo independiente de otros indicadores como una historia previa de periodontitis o el padecer Diabetes mellitus.

Por otro lado, el consumo de otros elementos tóxicos como el alcohol, ha sido similar en el GCA y el GCO; sin que se haya vinculado a la PI, como lo señalado hasta ahora (Carr et al., 2021).

En relación a los antecedentes médicos de los pacientes, no hemos observado asociación entre la PI y padecer alguna enfermedad sistémica. Desde hace tiempo se ha señalado que la diabetes mellitus es una patología que puede estar vinculada al desarrollo de la PI (Ferreira et al., 2006). No obstante, la mayoría de estudios que analizan su implicación no recogen datos importantes como el nivel glucémico de los pacientes (Taylor y Borgnakke 2008), o no la disocian de otros cofactores, como el tabaco o el antecedente de periodontitis (Daubert et al., 2015). En nuestro estudio no hemos reconocido ninguna relación con esta enfermedad, similar a otros autores (Roos-Jansaker et al., 2006; Máximo et al., 2008; Costa et al., 2012; Marrone et al 2013; Renvert et al., 2014; Derks et al., 2016; Rohn et al., 2017). Al igual que Genco et al., (2013), consideramos que es necesario realizar más estudios teniendo en cuenta los datos analíticos de los pacientes, para valorar adecuadamente esta posible asociación.

Otras enfermedades sistémicas investigadas en relación con la PI son la enfermedad cardiovascular, la artritis reumatoide, la osteoporosis, el hipotiroidismo o la enfermedad hepática, sin haber obtenido resultados concluyentes (Koldslund et al., 2011; Máximo et al., 2008; Renvert et al., 2014). Nosotros tampoco hemos observado ninguna asociación en los pacientes con PI con ninguna de estas patologías, ni con otros procesos de reciente interés como la depresión (Wang et al., 2022; Strooker et al., 2022) (**Tabla 1**). Como cabía esperar, el trastorno más prevalente en ambos grupos de estudio fue la hipertensión arterial, dada la edad de nuestra población de estudio.

Desde hace tiempo se ha considerado al antecedente de periodontitis como uno de los factores de riesgo más importantes en el desarrollo de la PI (Roccuzzo et al., 2012; Polymeri et al., 2022). Se ha señalado que el riesgo de padecer PI puede ser hasta 14 veces mayor en los pacientes que no acuden a terapia de mantenimiento periodontal (Ferreira et al., 2006; Rokn et al., 2017). Además, la presencia de periodontitis activa durante el tratamiento con implantes dentales incrementa entre 4 y 7 veces la probabilidad de desarrollar PI (Koldslund et al., 2010; Koldslund et al., 2011; de Araujo Nobre et al., 2015; Renvert et al., 2014; Dalago et al., 2017; Máximo et al., 2008; Daubert et al., 2015). En nuestro estudio no hemos observado una relación directa entre la aparición de PI y el antecedente de enfermedad periodontal, al igual que Marrone et al. (2013) y Canullo et al. (2016). Este resultado podría explicarse por el hecho de que la mayoría de pacientes incluidos en nuestros dos grupos de estudio, acudía rigurosamente a terapia de mantenimiento y mostraba un buen control periodontal, al igual que ocurría en el trabajo de Canullo et al., (2016)

En relación con la dentición, no se ha reconocido ninguna relación entre el edentulismo completo y la presencia de PI, al igual que la mayoría de las investigaciones (Dreyer et al., 2018; Strooker et al., 2022). Existía un mayor número de pacientes con ausencia

dental en el maxilar inferior (33,80%) y el sector posterior (33,70%), lo que ha coincidido con los datos reportados a nivel nacional (Bravo-Pérez et al., 2020).

En cuanto al tratamiento protésico colocado sobre los implantes, hemos reconocido una asociación entre la rehabilitación con puentes y el presentar PI. Varios autores (Gampe et al., 2017; Alhammadi et al., 2021) han señalado una POM significativamente mayor en los implantes con puentes que con coronas individuales. Este resultado podría estar relacionado con la dificultad para diseñar la supraestructura del implante, con una inadecuada conexión restauración-pilar o con un contorno excesivo de la restauración; que dificultarían considerablemente el acceso a una higiene oral adecuada, lo que favorecería el desarrollo de PI (Lang et al., 2011; Jepsen et al., 2015). Se ha demostrado que estas zonas presentan una mayor tasa de peri-implantitis (65%) que las áreas accesibles a una buena higiene (18%) (Serino & Strom, 2009).

En el momento del diagnóstico clínico, la PS media de los implantes con PI de nuestro estudio fue de  $5,13 \pm 1,3$  mm, con una POM media de  $5,55 \pm 1,1$  mm y con un número elevado de implantes (56,20%) que presentaban BOP; coincidiendo con los resultados obtenidos en la mayor parte de los estudios (Karoussis et al., 2003; Ferreira et al., 2006; Máximo et al., 2008; Costa et al., 2012; Marrone et al., 2013; de Araujo Nobre et al., 2015; Dalago et al., 2017; Schwarz et al., 2018).

## 5.2. En relación con los resultados genéticos

Los SNPs que más se han estudiado hasta la fecha en la enfermedad peri-implantaria corresponden a las interleuquinas proinflamatorias IL1 $\beta$  (+3953) e IL1 $\beta$  (-511); no obstante, todavía no se ha demostrado su relación con la aparición de PI (Esposito et al., 1998; Eguia et al., 2018; Lafuente-Ibáñez de Mendoza et al., 2022). Sólo los estudios de Feloutzis et al., (2003) y Gruica et al., (2004), han sugerido una posible asociación en pacientes fumadores  $\geq 20$  cig/día, entre el SNP IL1 $\beta$  (+3953) y la POM, pero no con la peri-implantitis. Debido a la falta de relación y a la ausencia de este SNP en la población de la CAPV, este SNP no fue finalmente incluido en nuestro análisis.

Hemos analizado el SNP de IL1 $\beta$  (-511), cuyo genotipo se ha relacionado con el desarrollo de periodontitis crónica (Yoshie et al., 2007). Varios autores (Shimpuku et al., 2003; Lin et al., 2007) han relacionado el IL1 $\beta$  (-511) y la PI en pacientes con una POM  $\geq 0,5$  mm. No obstante, aunque la POM puede ser el primer signo de una PI, el diagnóstico final actual se confirma con otros parámetros clínicos (BOP, PS y supuración al sondaje) (Schwarz et al., 2018), por lo que algunos casos de PI incluidos en estos estudios (Shimpuku et al., 2003; Lin et al., 2007) podrían reclasificarse actualmente como de salud peri-implantaria. Al igual que en nuestro caso, otros autores (Laine et al., 2006; Melo et al., 2012), tampoco han observado esta relación utilizando criterios diagnósticos de PI más precisos. Por todo ello, consideramos que el SNP IL1 $\beta$  (-511) no estaría vinculado directamente con la PI en población de la CAPV.

Otras interleuquinas importantes en la remodelación y la homeostasis ósea son la IL10 y la IL6. La IL10 es una citoquina anti-inflamatoria que reduce la síntesis de IL1, TNF $\alpha$  y otras proteínas de la matriz extracelular (gelatinasa, colagenasa), al tiempo que potencia la diferenciación osteoblástica e inhibe la activación osteoclástica (Zhang et al., 2014).

No obstante, todavía no se ha reconocido una asociación entre el SNP IL10 (-1081) y la aparición de PI, al igual que ocurre en nuestro estudio (Gurol et al., 2011; Petkovic-Curcin et al., 2017). Este resultado es parecido al obtenido con el SNP IL6 (-174), que sólo se relacionó con la PI en individuos de Serbia (Melo et al., 2006; Ladeira-Casado et al., 2013; Petkovic-Curcin et al., 2017). La IL6 posee un doble papel en el remodelado óseo, suprimiendo la resorción ósea en condiciones normales, al inhibir la diferenciación de los progenitores de los osteoclastos; e induciendo la expresión del RANKL en condiciones inflamatorias en los osteoblastos, facilitando la proliferación de los progenitores osteoclásticos (Yoshitake et al., 2008). Por ello, los resultados de la relación del SNP IL6 (-174) con la PI pueden ser controvertidos (Melo et al., 2006; Ladeira-Casado et al., 2013). En nuestro caso, tampoco hemos sido capaces de reconocer una asociación entre esta mutación y la aparición de PI.

Se ha reconocido que la actividad osteoclástica está modulada por CD14 y RANKL (Massey y Flanagan, 1999). La proteína CD14 regula la diferenciación de los monocitos en osteoclastos, mientras que RANKL induce la osteoclastogénesis en los osteoclastos ya maduros (Sørensen et al., 2007). Los trabajos sobre SNPs realizados hasta la fecha en población serbia y alemana no han encontrado una relación entre CD14 (-159) y el desarrollo de la PI (Rakic et al., 2015; Petkovic-Curcin et al., 2017). Del mismo modo, tampoco se ha observado asociación del RANKL (-438) en población iraní y brasileña (Kadkhodazadeh et al., 2013; Ribeiro et al., 2017; Reis et al., 2020). Estos resultados coinciden con los obtenidos en nuestro estudio con población de la CAPV.

Otra proteína implicada en el remodelado óseo es la LTF, glicoproteína transferrina que está presente en la secreción salival y en los gránulos neutrofilicos inflamatorios (Naot et al., 2005). En condiciones fisiológicas, la LTF constituye un factor defensivo antimicrobiano e inmunomodulador salival frente a las infecciones bacterianas, incluida

la de los peri-implantopatógenos (Naot et al., 2005). Se sabe que la LTF también estimula la proliferación y diferenciación osteoblástica para producir nueva matriz ósea, a la vez que la inhibe la acción osteoclástica, estimulando la unión de la OPG al RANK (Naot et al., 2005). No obstante, sólo un grupo de autores brasileños ha estudiado el SNP de LTF (rs1126477), sin haber reconocido una asociación positiva con la aparición de PI (Doetzer et al., 2015); lo que coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio, y señala la existencia de variantes patogénicas específicas en los pacientes con PI que hemos estudiado.

En el análisis comparativo que hemos realizado en nuestro estudio entre los pacientes con y sin PI hemos podido observar diferencias significativas en relación con la presencia de SNPs poco investigados como: GBP1 rs7911 y BRINP3 rs1935881.

La GBP1 es una enzima que se expresa en las células endoteliales y en los linfocitos T (CD4 y CD8) (Honkala et al., 2020). La enzima GBP1 regula la respuesta celular macrofágica frente a los PAMP (Honkala et al., 2020), y también disminuye la proliferación epitelial y endotelial en la resolución de la respuesta inflamatoria (Capaldo et al., 2012; Forster et al., 2014). Además, se sabe que GBP1 desempeña un importante papel en la inmunidad celular autónoma frente a patógenos intracelulares (Tietzel et al., 2009; Zhu et al., 2013). Por todo ello, pensamos que la mutación de GBP1 podría motivar una respuesta inflamatoria ineficaz contra los peri-implantopatógenos implicados en el proceso de PI.

Se ha demostrado que el SNP GBP1 rs7911 está implicado en la infección crónica activa producida por el virus de *Epstein-Barr* (Kim et al., 2011). Sin embargo, todavía no existen estudios que hayan analizado este polimorfismo en relación con la PI, excepto el nuestro. Creemos que, dado que muchos peri-implantopatógenos involucrados en la PI son

intracelulares (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, etc.), hace falta realizar estudios en otras poblacionales que analicen este SNP y permitan conocer su verdadero rol en el desarrollo de la PI.

La proteína BRINP3 es una proteína morfogenética ósea perteneciente a la familia de los TGF $\beta$ , una súper familia de proteínas con capacidad inductora de neoformación ósea y conectiva (Kawano et al., 2004). Las BMPs son un conjunto de 15 proteínas osteoinductivas de las células osteoprogenitoras, que regulan la diferenciación osteoblástica durante el remodelado óseo y promueven la regeneración ósea (Anderson et al., 2000). Asimismo, estimulan la diferenciación de las células pluripotenciales en diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago, hueso). Sólo un grupo de autores (Casado et al., 2015) ha reconocido la existencia de una asociación entre la presencia de BRINP3 rs1935881 y el desarrollo de PI en población brasileña. A la vista de nuestros resultados coincidentes, consideramos que este polimorfismo podría condicionar una alteración en el proceso de osteointegración peri-implantaria que favoreciese la aparición de PI.

Además de estas relaciones, en nuestro estudio hemos identificado asociaciones significativas de varios SNPs en pacientes con PI, y con factores de riesgo reconocidos.

Los pacientes con peri-implantitis que fumaban más de 10 cigarros al día mostraron una relación significativa de la presencia del SNP OPG rs2073617 ( $p=0,034$ ). La OPG es una importante proteína que se expresa en la superficie de los osteoblastos y que, al unirse al RANK, actúa como receptor antagonista de la RANKL; con lo que evita la reabsorción ósea (Wright et al., 2009). Dos grupos de autores (Kadkhodazadeh et al., 2012; Zhou et al., 2016), han demostrado la asociación de la presencia del SNP OPG rs2073617 y la aparición de PI. Desde hace tiempo se conoce, que los pacientes fumadores presentan una



menor producción y concentración de OPG en el fluido crevicular, probablemente por acción de la nicotina a nivel osteoblástico (Tanaka et al., 2006; Lappin et al., 2007); lo que explicaría, en parte, la pérdida ósea que se observa en los pacientes fumadores con PI (Liu et al., 2002; Mogi et al., 2004), tal y como ocurriría en nuestro estudio.

Los pacientes con peri-implantitis y diabetes mellitus mostraron una relación significativa de la presencia de los polimorfismos BMP4 rs17563 y FGF-3 rs1893047.

Se ha considerado al eje BMP/FGF como uno de los pilares más importantes en la osteointegración de los implantes dentales (Marie, 2003; Patel et al., 2008). Las BMPs y FGFs son dos grupos proteicos de los TGF $\beta$ s que participan de manera activa en la regeneración ósea y angiogénica (Anderson et al., 2000). La liberación de estas proteínas durante la neoformación ósea aumenta la proliferación de células osteoprogenitoras y de fibroblastos (Guimarães et al., 2013). De este modo, la BMP4 juega un papel importante en la curación de fracturas óseas en la edad adulta, y además sus variaciones genéticas se han asociado a una disminución de la densidad ósea en las mujeres posmenopáusicas (Ramesh et al., 2005). Junto a esta actividad ósea, se ha demostrado que las BMPs también regulan la homeostasis de la glucosa, la morfogénesis de los islotes pancreáticos y la masa de células  $\beta$  en el páncreas (Pauk et al., 2019; Schulz & Tseng, 2009; Goulley et al., 2017). De manera específica, la BMP4 reduce la captación de glucosa por los adipocitos y tiene un efecto antagónico sobre la señalización de la insulina, induciendo resistencia (Ahrens et al., 1993; Bowers & Lane, 2007; Chattopadhyay et al., 2017). Estas últimas funciones explicarían la asociación reconocida entre la presencia del SNP BMP4 rs17563 en los pacientes diabéticos con PI (Perera et al., 2019), como hemos podido reconocer en nuestro estudio.

Por otro lado, la FGF3 es una proteína mitogénica osteoblástica, fibroblástica y endotelial que promueve la angiogénesis y la curación de las heridas, estimulando la formación de nueva matriz colagénica (Anderson et al., 2000; Guimarães et al., 2013). Los FGF y sus receptores son moléculas importantes en el desarrollo del páncreas y los islotes pancreáticos maduros (Arnaud-Dabernat et al., 2007). Por ello, su alteración podría condicionar alteraciones en la secreción de insulina, explicando, en parte, los resultados que hemos obtenido.

Únicamente Coelho et al., (2016) han demostrado la existencia de una asociación significativa entre los SNPs de BMP4 y FGF3 y el desarrollo de PI en pacientes brasileños, sin que conozcamos su estatus en relación con presentar diabetes mellitus. No obstante, debemos señalar que el número de pacientes con esta patología incluidos en nuestro trabajo ha sido escaso, por lo que es necesaria la realización de más estudios que refuercen estos resultados.

Para finalizar la discusión de este apartado, es importante señalar que ninguno de los SNPs inicialmente asociados a la presencia de PI en nuestro estudio (GBP1, BRINP3, OPG, BMP4, FGF3) ha incrementado el riesgo de PI, tras realizar el análisis de regresión.

### **4.3. En relación con los datos citológicos**

La citología exfoliativa oral se basa en el estudio y la interpretación de las características morfológicas de las células exfoliadas natural o artificialmente de la mucosa oral (Acha et al., 2005; Cecilia et al., 2014). En 1967, Lange fue el primero en realizar un estudio histomorfológico y citomorfológico de la mucosa gingival mediante raspado del epitelio marginal y su tinción con Papanicolaou (Lange, 1967). Las extensiones citológicas de una encía sana muestran células superficiales y, en menor cantidad, células intermedias del estrato espinoso (Diniz-Freitas et al., 2004).

Los hallazgos citológicos observados en la enfermedad periodontal son similares a los obtenidos en otros procesos inflamatorios (Koss, 1961), y se caracterizan por la presencia de restos celulares poco teñidos (detritus), leucocitos polimorfonucleares y hematíes (Saki et al., 1960). Muy pocos estudios han valorado el uso de citología exfoliativa como método diagnóstico y de control en la enfermedad periodontal (Stahl, 1967; Cecilia et al., 2014).

La inflamación periodontal reduce la capacidad de queratinización del epitelio, facilitando la descamación y exfoliación de las capas más superficiales, y aumentando la proliferación de los queratinocitos de las capas más profundas (Lange, 1965; Endo et al., 2008). El estudio de Cecilia et al., (2014) demostró que la cantidad de PMNs y células epiteliales (superficiales e intermedias) era mayor en las muestras citológicas gingivales de pacientes con periodontitis. También reconocieron diferencias significativas en relación con la gravedad de la enfermedad; observando más células epiteliales y PMNs en las extensiones de periodontitis agresiva y de periodontitis crónica severa (Cecilia et al., 2014).

Muy pocos autores (Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014) han analizado extensiones citológicas de la mucosa peri-implantaria; observando, en los casos con PI, un mayor número de colonias bacterianas y células inflamatorias agudas y crónicas. Nuestro trabajo es el primero que analiza el perfil citológico de la mucosa peri-implantaria de implantes en salud y de implantes con PI; y lo correlaciona con los diferentes aspectos clinicopatológicos de este trastorno. El análisis de los diferentes elementos citológicos valorables podría ser útil para el diagnóstico y la evaluación de severidad de la enfermedad peri-implantaria, constituyendo un método de diagnóstico complementario sencillo, fácil y mínimamente agresivo.

Las células epiteliales han sido el elemento citológico más observado en las preparaciones, siendo más abundante en las muestras de los pacientes con PI. Estos resultados son similares a los de Cecilia et al., (2014) en muestras de pacientes con periodontitis agresivas. Las células epiteliales de las muestras de mucosa peri-implantaria sana se disponían de forma más dispersa que en las muestras de PI, donde se reconocían agrupamientos celulares de queratinocitos junto a otros elementos, preferentemente detritus y colonias bacterianas.

La mucosa peri-implantaria es un epitelio poliestratificado plano que muestra diferentes grados de queratinización, desde no queratinizado, hasta paraqueratinizado u ortoqueratinizado (Berglundh & Lindhe, 1996; Araujo & Lindhe, 2018). Las células epiteliales anucleadas se encuentran en las capas más superficiales del epitelio y corresponden a zonas ortoqueratinizadas. La ortoqueratosis es un factor protector para la mucosa oral, que le aporta un mayor grosor y resistencia, constituyendo la primera línea defensiva frente a agentes irritativos externos, incluyendo los peri-implantopatógenos (Groeger & Meyle, 2019). La inflamación peri-implantaria y el fenómeno de remodelado

epitelial fisiológico al que se somete la mucosa oral explicarían la pérdida de queratinización y la identificación de células epiteliales anucleadas que hemos observado.

La presencia de células epiteliales nucleadas es un dato importante a la hora de valorar las extensiones citológicas de la mucosa peri-implantaria. La observación de queratinocitos intermedios en los extendidos citológicos sugiere que la mucosa de la que se desprenden es más lábil; y que el proceso inflamatorio subyacente, con mediadores proinflamatorios capaces de dañar el epitelio (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ), favorecen que se desprenda con mayor facilidad (Kamekura et al., 2015; Yulis et al., 2018). La pérdida de queratinización y la atrofia epitelial contribuiría al debilitamiento de la mucosa peri-implantaria y favorecería el proceso infeccioso e inflamatorio microbiano.

Se ha descrito que el grosor de la mucosa peri-implantaria es mayor que la mucosa peridentaria (2,0 mm vs 1,1 mm) (Chang et al., 1990; Chang & Wennström 2013; Parpaiola et al., 2015). En la actualidad se considera que la presencia de encía queratinizada es un factor muy importante en la patogenia de la PI (Wennstrom & Derks, 2016). Varios estudios (Gobbato et al., 2013; Lin et al., 2013; Ladwein et al., 2015; Esfahanizadeh et al., 2016; Souza et al., 2016; Ueno et al., 2016) han demostrado que una encía queratinizada menor de 2 mm se asocia con un mayor acúmulo de placa bacteriana y un BOP más elevado, ya que dificulta la higiene peri-implantaria y aumenta el proceso inflamatorio. Otros autores (Canullo et al., 2016; Rocuzzo et al., 2016), también han demostrado una relación entre el desarrollo de PI y la presencia de una encía queratinizada menor de 2 mm.

Hemos identificado una mayor cantidad de células epiteliales nucleadas y anucleadas en los extendidos citológicos de mucosa peri-implantaria con PI, lo que sería indicativo de que se está produciendo un mayor desprendimiento epitelial, favorecido por el proceso

inflamatorio. La presencia de abundantes células epiteliales nucleadas y anucleadas en un extendido citológico peri-implantario confiere un mayor riesgo de 21 y 4 veces respectivamente, para presentar PI.

La identificación de detritus y de acúmulos bacterianos (cocos y bacilos) son dos elementos importantes en el análisis de los extendidos citológicos de la mucosa peri-implantaria. En nuestro análisis, las muestras de los pacientes con PI han mostrado un mayor componente significativo de detritus y de acumulación bacteriana cocácea y bacilar.

En citología oral se considera “detritus” a un conglomerado irregular, generalmente basófilo, constituido por restos de material orgánico con células epiteliales, inflamatorias y elementos microbianos (Saki et al., 1960). Otros estudios (Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014) han obtenido resultados similares a los nuestros, constatando la presencia de una microbiota más abundante en los casos con PI, y más escasa en los casos con salud peri-implantaria.

El acúmulo de placa bacteriana es el principal factor de riesgo para la enfermedad peri-implantaria (Costa et al., 2017; Heitz-Mayfield y Salvi, 2018). Se ha considerado que la colonización peri-implantopatógena comienza durante la primera semana tras la colocación de los implantes dentales (Quirynen et al., 2006). Varios estudios (Koldsland et al., 2011; Rinke et al., 2011; Marrone et al., 2013; de Araujo et al., 2015; Canullo et al., 2016; Monje et al., 2017) han revelado una mayor incidencia de PI en las zonas que presentaban un alto índice de placa y un peor acceso para la higiene. En nuestro estudio, la presencia de acúmulos de microbiota en los extendidos citológicos ha supuesto un riesgo 2 veces mayor para el desarrollo de PI.

Rams y Link (1983) fueron los primeros en señalar la existencia de diferencias microbiológicas entre los implantes sanos, que presentan formas cocáceas, y los implantes con PI, con formas más complejas (Rams et al., 1984). En nuestro análisis, las formaciones microbianas complejas (mazorcas, espiroquetas) han sido más frecuentes en las extensiones correspondientes a implantes con PI.

La placa dental es el resultado de la acumulación de bacterias orales en una matriz adherente con polisacáridos y productos bacterianos y del hospedador (Lancy et al., 1980). A medida que madura, la microbiota inicial, predominantemente cocácea Gram positiva, se mezcla con bacilos Gram positivos, cocos Gram negativos y formas filamentosas (Ritz, 1967). La bacteria *S. sanguis* es uno de los primeros microorganismos en colonizar la superficie dental, posiblemente debido a su afinidad por las glicoproteínas salivales (Carlsson, 1967; Carlsson et al., 1970). En 1972, Jones (1972) observó una relación microbiana específica entre cocos de *S. sanguis*, que se encontraban adheridos a la superficie exterior un microorganismo filamentosos, constituyendo formaciones complejas similares a “mazorcas de maíz” (Listgarten et al., 1965). Estas estructuras especiales suelen aparecer en la placa dental madura a partir del 10º día, y están formadas por hasta 10 cocos de *S. sanguis* rodeando a una estructura filamentosos central Gram positiva de *Bacterionema matruchotii* (Listgarten et al., 1965; Takazoe et al., 1978; Lancy et al., 1980).

En nuestro estudio hemos constatado, por primera vez, la presencia de estas formas microbianas complejas, que se han asociado en los pacientes con PI de manera significativa, a una PS y POM mayor de 5 mm. La organización estructural de la placa bacteriana alrededor de los implantes con PI estaría relacionada con la progresión y gravedad de la enfermedad peri-implantaria; de manera que la mucosa peri-implantaria en salud mostraría acúmulos de placa bacteriana “simple y joven” y la mucosa con peri-

implantitis, acúmulos de placa bacteriana “compleja y madura” (Lucchese et al., 2014). Pensamos que estas diferencias pueden ser útiles para el diagnóstico y la monitorización de los pacientes con PI.

Aunque la invasión microbiana tisular intercelular es más frecuente que la intracelular, la microbiota intracelular polimicrobiana activa (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*) es común en los queratinocitos del tejido con peri-implantitis (Rudney et al., 2005; Rudney et al., 2006; Tribble & Lamont, 2010). Las células invadidas proporcionan a las bacterias un entorno rico en nutrientes y libre de células inmunológicas, lo que facilita su replicación y la resistencia a los antibióticos, dificultando su eliminación y permitiendo el mantenimiento de la inflamación (Eick et al., 2004; Johnson et al., 2008). Las bacterias intracelulares tratan de evitar las defensas del hospedador (vacuolas ácidas lisosomales) (Dorn et al., 2000), reprogramando las principales vías de señalización de las células del huésped, y secretando diferentes proteasas bacterianas que mantienen la destrucción de los tejidos peri-implantarios (Huang et al., 1998; Huang et al., 2001; Yun et al., 2001; Grayson et al., 2003; Huang et al., 2004; Sheets et al., 2005; Ji et al., 2007; Stathopoulou et al., 2009; Tam et al., 2009). Estos hallazgos explicarían que la observación de células epiteliales colonizadas por gérmenes sea un indicador de la progresión y agresividad de la enfermedad peri-implantaria; así como el elevado riesgo de hasta 3 veces más que confiere su presencia en los extendidos citológicos.

La colonización bacteriana de los tejidos peri-implantarios condiciona una respuesta inmunológica en el hospedador, que incluye cambios a nivel vascular y celular, atrayendo células inflamatorias crónicas (linfocitos) y agudas (PMNs) (Sanz et al., 2001). El perfil inflamatorio de la PI es por lo general mixto y está constituido por linfocitos, PMNs, macrófagos y células plasmáticas (Bullon et al., 2004; Konttinen et al., 2006).



Citológicamente, los extendidos citológicos de PI presentan un mayor número de PMNs (Guallini et al., 2003; Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014), como hemos podido observar de manera significativa en nuestro estudio.

Los PMNs son las células principales de la respuesta inflamatoria aguda y juegan un papel clave en la osteoclastogénesis del tejido peri-implantario (Kawai et al., 2006). La diferenciación de los monocitos en osteoclastos requiere la unión del RANK con su ligando (RANKL) (Asagiri & Takayanagi, 2007). La llegada de RANKL se produce por la interacción entre los monocitos y diferentes células del periodonto, incluidos los PMNs, linfocitos T y B, y osteocitos del hueso marginal (Sokos et al., 2015). Conocemos que la infección peri-implantopatogena de la mucosa peri-implantaria condiciona una respuesta inmune innata mantenida, a expensas, preferentemente, de los PMNs (Steeve et al., 2004; Zhang et al 2007; Kocgozlu et al., 2009). Los PMNs también estimulan la secreción de citoquinas pro-inflamatorias (IL1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), que refuerzan su acción reabsortiva ósea, independientemente de la vía del RANKL (Steeve et al., 2004; Zhang et al 2007; Kocgozlu et al., 2009).

La actividad osteoclastogénica de los PMNs puede verse modulada por los linfocitos T y B activados (Kong et al., 1999; Hofbauer et al., 2000; Wu et al., 2005; Riegel et al., 2012); que también secretan, aunque en menor medida, citoquinas implicadas en la destrucción tisular peri-implantaria (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ) (Teitelbaum, 2000; Choi et al., 2001; Wei et al., 2005).

En base a este conocimiento previo, pensamos que el análisis de las células inflamatorias de los extendidos citológicos de la mucosa peri-implantaria podría ser útil para conocer mejor su estado inflamatorio. La presencia de PMNs sería indicativo de una inflamación aguda y destructiva, con un mayor nivel de reabsorción ósea; mientras que la presencia

de linfocitos estaría relacionada con un proceso inflamatorio crónico de inmunovigilancia protectora, frenadora del avance destructivo. Esta hipótesis se ve reforzada por la identificación de una mayor cantidad de PMNs en los extendidos de PI, cuya presencia supone un riesgo 3 veces mayor de padecer PI. Por el contrario, la mayor cantidad de linfocitos en los extendidos sin PI ha constituido un elemento significativamente protector.

Curiosamente, la presencia de hematíes ha sido el dato citológico menos observado en las preparaciones citológicas de nuestro estudio; aunque ha sido mayor en los extendidos de la mucosa con PI.

El BOP es un parámetro clínico importante en la patología peri-implantaria, y puede aparecer en otros cuadros inflamatorios como la MPI, descrita como una lesión inflamatoria de la mucosa que rodea un implante endóseo sin pérdida del hueso de soporte (Albrektsson & Isidor, 1994; Zitzmann & Berglund, 2008). Los signos clínicos de la MPI son el eritema, la inflamación de la mucosa peri-implantaria y el BOP (Lindhe & Meyle, 2008; Heitz-Mayfield & Salvi, 2018). La conversión de MPI en PI es alta, de hasta el 40% (Costa et al., 2012); por lo que la identificación de hematíes en las extensiones citológicas de mucosa peri-implantaria supondría una mayor debilidad del tejido, y podría ser útil para valorar el inicio de una PI como transición desde una MPI.

En nuestro análisis, hemos observado una correlación significativa entre la presencia conjunta de detritus, microbiota simple, PMNs y linfocitos en todos los grupos de estudio ( $p < 0,05$ ). No obstante, solo en las muestras citológicas de la mucosa con PI hemos reconocido una asociación estadísticamente significativa entre la presencia de hematíes y de PMNs ( $p < 0,01$ ) (**Apéndice 5**). Este resultado permitiría diferenciar el significado del BOP en un paciente con MPI (sólo hematíes) y el BOP de un paciente con PI (hematíes

y PMNs). De este modo, se explicaría por qué la identificación de hematíes en los extendidos aumenta hasta 4 veces el riesgo de padecer PI.

La citología exfoliativa por raspado es una técnica diagnóstica barata, incruenta, sencilla y útil en muchos procesos patológicos orales (Acha et al., 2006). Hemos obtenido una sensibilidad y una especificidad medias para los principales datos citológicos observados en esta patología, que nos permiten considerarla una herramienta diagnóstica complementaria que puede tener una gran utilidad para el diagnóstico precoz de la PI y el control de los pacientes con implantes dentales.

#### 5.4. En relación con los datos micológicos

*Candida spp.* es un hongo saprófito cuya frecuente presencia e implicación en la cavidad oral, como factor etiopatogénico de diferentes trastornos, incluidos malignos, ha sido objeto de un gran interés desde tiempo inmemorial (Aguirre, 2002). Nuestro estudio es el primero que analiza la presencia de *Candida spp.* en pacientes con PI, recogiendo muestras intraorales (enjuague) y del fluido peri-implantario (puntas de papel), tratando de valorar su papel patogénico en la peri-implantitis.

Hemos obtenido crecimiento de *Candida spp.* en las muestras intraorales tomadas mediante enjuague en el 27,95% del total de individuos estudiados. Este porcentaje difiere del obtenido en otros trabajos realizados en la CAPV en población similar (48,50%) (de la Torre et al., 2018). Pensamos que esta diferencia se debe a que nuestros pacientes, tratados con implantes dentales, siguen un protocolo de mantenimiento específico de higiene oral que incluye la realización de enjuagues con antisépticos, preferentemente clorhexidina al 0,12-0,2% (Lang et al., 2000). Además, la mayoría de los cultivos fueron simples; y correspondían de un modo preferente a *C. parapsilosis* (26,70%) y *C. albicans* (24,40%), lo que también podría estar relacionado con la utilización de enjuagues con clorhexidina de los pacientes.

La clorhexidina es una clorofenil bisbiguanida altamente catiónica que posee un efecto antifúngico reconocido frente a *C. albicans* (Ellepola & Samaranayake, 2001). Esta propiedad podría haber condicionado su menor presencia en los pacientes de nuestro estudio, en comparación con otras cepas de *Candida* que serían más resistentes, incluidas las de *C. parapsilosis*. La molécula de clorhexidina se une directamente a las superficies orales con carga negativa, incluidas las fúngicas, induciendo la fragmentación parietal y

la coagulación de las nucleoproteínas de *C. albicans*, inhibiendo su crecimiento (Audus et al., 1992; MacNeill et al., 1997).

Un aspecto destacable de nuestro estudio ha sido la alta prevalencia de *C. parapsilosis*, tanto en cultivos simples como mixtos. La especie *C. parapsilosis* se describió por primera vez como una levadura comensal no patógena sin relevancia clínica (Weems, 1992). Sin embargo, el aumento del uso de dispositivos médicos y de las infecciones nosocomiales, ha aumentado su incidencia (Krcmery et al., 2002). Un factor patogénico característico de *C. parapsilosis* es su capacidad para formar *biofilms* sobre dispositivos médicos, junto con otras especies de *Candida* (Pammi et al., 2013), mediante la formación de pseudohifas y la expresión de adhesinas en su pared celular (Butler et al., 2009; Rossignol et al., 2009; Prysycz et al., 2013; Neale et al., 2018). Esta especie muestra una gran afinidad para adherirse a los diferentes materiales de los dispositivos sanitarios, como las resinas de las prótesis removibles, las superficies metálicas de las supraestructuras protésicas o la superficie de titanio de los implantes dentales (De Bernardis et al., 1999; Kuhn et al., 2002; Pannanusorn et al., 2014; Trofa et al., 2008; Neji et al., 2017). En este sentido, se ha propuesto la utilización de antifúngicos (azoles, equinocandinas, polienos) para evitar la formación de biopelículas de *Candida spp.* en relación con los implantes dentales (Imbert et al., 2018).

Otro resultado interesante observado en nuestro análisis ha sido el reconocimiento de una relación estadísticamente significativa de la presencia intraoral de *Candida spp.* en las muestras de enjuague oral del GCO, correspondientes a pacientes edéntulos, portadores de sobredentaduras o prótesis híbridas (Kilic et al., 2014). Creemos que la falta de esta asociación en los pacientes del GCA se debe a la existencia de un menor número de pacientes edéntulos y/o portadores de prótesis híbridas o sobredentaduras. Estas relaciones nos indican que la presencia intraoral de *Candida* estaría estrechamente

relacionada con la rehabilitación protésica y sería independiente del diagnóstico de PI. La adhesión de este hongo va a depender de la microporosidad presente en la superficie protésica, que posibilita la colonización y permanencia de *Candida* y de otras bacterias (*S. sanguis*, *S. gordonii*, etc.), formando colonias mixtas que dificultan su eliminación (Ferreira et al., 2009).

Al igual que ocurren en los pacientes no tratados con implantes dentales, la rehabilitación protésica es un importante elemento favorecedor de la colonización oral por *Candida spp.*

Aunque el surco peri-implantario podría ser un nicho adecuado para la colonización por *Candida spp.*, en nuestro estudio sólo el 4,20% de las muestras del fluido peri-implantario de pacientes sin PI y el 10% de las muestras de pacientes con PI, presentaron crecimiento fúngico. Estas cifras son parecidas a las obtenidas en estudios previos (Albertini et al., 2015; Schwarz et al., 2015), incluidos los realizados en población española (Canullo et al., 2015).

Los diferentes dispositivos médicos (marcapasos, prótesis, implantes dentales, etc.) pueden ser colonizados por microorganismos específicos, incluido *Candida spp.*, y formar biopelículas patógenas adheridas (Ramage et al., 2006). La adhesión de *Candida* al titanio depende de diferentes factores de su superficie como: rugosidad, energía libre del material, propiedades químicas, etc. (Nakazato et al., 1989; Bürgers et al., 2010). Se conoce que una mayor rugosidad superficial del implante promueve una osteointegración más firme y rápida (Bürgers et al., 2010), sin embargo, ello también aumentaría la colonización bacteriana y fúngica (Quirynen et al. 2001; Park et al., 2003). Esta circunstancia justificaría el tratamiento no quirúrgico de la PI, mediante la descontaminación de la superficie del implante, realizando su alisamiento (Estefanía-Fresco et al., 2019).

Las especies de *Candida* identificadas en las muestras del fluido peri-implantario en nuestro estudio, han sido similares a las obtenidas en las muestras de enjuague oral, *C. albicans* y *C. parapsilosis*; coincidiendo con los resultados de otros estudios (Bertone et al., 2016; Alrabiah et al., 2019; Alsahhaf et al., 2019). A pesar de la baja frecuencia, la mayor parte de los cultivos tuvieron un crecimiento mayor de 50 UFC.

La presencia de *Candida* en las muestras del fluido peri-implantario se ha asociado significativamente con la presencia de detritus y de linfocitos en los extendidos citológicos tanto de implantes en salud como con PI. La acumulación en el nicho peri-implantario de elementos bacterianos, epiteliales mucosos, proteicos, etc. (detritus), asociados a una mala higiene oral, facilitaría el crecimiento fúngico (Salerno et al., 2011). Por otro lado, un aumento del exudado inflamatorio peri-implantario podría favorecer la adhesión y la proliferación de levaduras de *Candida* en la superficie peri-implantaria (Salerno et al., 2011).

En base a nuestros resultados, podemos señalar que los hongos del género *Candida* no parece tener un gran papel patogénico en la PI presente en nuestros pacientes con implantes dentales en control. No obstante, es un elemento microbiológico oral que puede ser importante en algunos casos, sobre todo en base a su asociación a microbiota compleja, con simbiosis con otros peri-implantopatógenos presentes en los tejidos peri-implantarios. Como señalan Canullo et al., (2015), sería interesante conocer la vinculación de *Candida spp.* con los principales microorganismos patógenos asociados a la PI, preferentemente bacterianos, y con ello su verdadera implicación en el mantenimiento del proceso inflamatorio peri-implantario.





## 6. CONCLUSIONES

1. Los pacientes diagnosticados de PI de la CAPV estudiados, no muestran características generales diferentes a las observadas en otras poblaciones con esta patología.
2. Hemos reconocido una mayor presencia de los polimorfismos genéticos de GBP1 y BRINP3 en los pacientes con PI, que estaría relacionada con alteraciones en el remodelado óseo y/o en la respuesta inflamatoria.
3. Hemos reconocido una mayor presencia de los polimorfismos genéticos de OPG, BMP4 y FGF3 en los pacientes con PI, consumidores de tabaco y/o afectados de diabetes mellitus, que estaría relacionada con alteraciones en el remodelado óseo.
4. La presencia de los polimorfismos genéticos de GBP1, BRINP3, OPG, BMP4 y FGF3 en población de la CAPV no aumenta el riesgo de desarrollar PI.
5. Los extendidos citológicos de la mucosa peri-implantaria con PI muestran una significativa mayor cantidad de detritus, células epiteliales, acúmulos microbianos, hematíes y polimorfonucleares, que los de la mucosa peri-implantaria sana.
6. La presencia de una microbiota compleja en los extendidos citológicos de la mucosa peri-implantaria con PI se asocia a una mayor gravedad de la enfermedad.
7. La presencia individual de células epiteliales, acúmulos microbianos, hematíes o polimorfonucleares en los extendidos citológicos de la mucosa peri-implantaria, aumenta el riesgo de desarrollar PI. Por el contrario, la presencia de linfocitos confiere protección.
8. El estudio citológico de la mucosa peri-implantaria, como procedimiento diagnóstico, ha presentado una sensibilidad media del 76,66% y una especificidad del 73,33%, por lo

que consideramos que puede ser de utilidad para el diagnóstico precoz de la PI y el control de los pacientes con implantes dentales.

9. No hemos observado diferencias significativas entre los pacientes con PI y sin PI en relación con la presencia de *Candida spp.*, tanto en las muestras de la cavidad oral como en las del fluido peri-implantario.

10. Hemos reconocido una asociación significativa de la presencia de *Candida spp.* en el fluido peri-implantario, y la observación de detritus y linfocitos en los extendidos citológicos de los tejidos peri-implantarios.

11. Es necesario realizar más estudios sobre esta frecuente enfermedad, que confirmen nuestros resultados y nos permitan conocer mejor su etiopatogenia, para realizar un diagnóstico precoz, una buena terapéutica y un control apropiado.



## 7. BIBLIOGRAFÍA

- Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Martínez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cáncer y precáncer oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10(2):95-102.
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI, Lindhe J, Eriksson B et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures:(I). A 3-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac*. 1986;15(1):39-52.
- Aguirre-Urizar JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19(1):17-21.
- Aguirre-Zorzano LA, Estefania-Fresco R, Telletxea O, Bravo M. Prevalence of peri-implant inflammatory disease in patients with a history of periodontal disease who receive supportive periodontal therapy. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(11):1338–1344.
- Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol*. 1993;12(10):871–880.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-680.
- Albertini M, López-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(8):937-941.

- Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: clinical and radiographic observations. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):997–1002.
- Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface characteristics. An experimental study in dogs II: histological observations. *Clin Oral Implant Res.* 2009;20(4):366–371.
- Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In Lang NP, Karring T. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology.* Quintessence (Chicago);1994:365.
- Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H. “Peri-Implantitis: A Complication of a Foreign Body or a Man-Made “Disease”. Facts and Fiction. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2016;18(4):840-849.
- Albouy JP, Abrahamsson I, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2012;39(2):182-187.
- Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol.* 1991;10(1):11-18.
- Alhammedi SH, Burnside G, Milosevic A. Clinical outcomes of single implant supported crowns versus 3-unit implant-supported fixed dental prostheses in Dubai Health Authority: a retrospective study. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):1-11.

- Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojaly SA, Abduljabbar T, Javed, F. Presence of *Candida* species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clin Implants Dent Relat Res*. 2019;21(4):781-785.
- Alsahhaf A, Al-Aali KA, Alshagroud RS, Alshiddi IF, Alrahlah A, Abduljabbar T, et al. Comparison of yeasts species in the subgingival oral biofilm of individuals with type 2 diabetes and peri-implantitis and individuals with peri-implantitis without diabetes. *J Periodontol*. 2019;90(12):1383–1389.
- Anderson HC, Hodges PT, Aguilera XM, Missana L, Moylan PE. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(11):1493-1502.
- Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Perio Res*. 1989;24(2):96-105.
- Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trend Microbiol*. 2017;25(1):62-75.
- Araujo MG, Lindhe, J. Peri-implant health. *J Periodonol*. 2018;89(1):S249-S256.
- Arnaud-Dabernat S, Kritzik M, Kayali AG, Zhang YQ, Liu G, Ungles C, et al. FGFR3 is a negative regulator of the expansion of pancreatic epithelial cells. *Diabetes*. 2007;56(1):96-106.
- Asagiri M, & Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251-264.

- Asbell Milton B. *Dentistry. A historical perspective: being a historical account of the history of dentistry from ancient times with emphasis upon the United States from the colonial to the present period.* Bryn Mawr PaDorrance & Co (Fort Myers) 1988:1-256.
- Audus KL, Tavakoli-Saberi MR, Zheng H, Boyce EN. Chlorhexidine effects on membrane lipid domains of human buccal epithelial cells. *J Dent Res.* 1992;71:1298-1303.
- Baires-Varguez L, Cruz-García A, Villa-Tanaka L, Sánchez-García S, Giatan-Cepeda LA, Sanchez-Nargas LO, et al. Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (REPD) analysis and ATD ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24(2):148-151.
- Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1990;5(1):1-17.
- Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archi Oral Biol.* 2014;59(1):66-72.
- Berglundh T, Gislason O, Lekholm U, Sennerby L, Lindhe J. Histopathological observations of human periimplantitis lesions. *J Clin Periodontol.* 2004;31(5):341–347.
- Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa: biological width revisited. *J Clin Periodontol.* 1996;23(10):971-973.
- Berglundh T, Zitzmann N, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol.* 2011;38:188–202.

- Bertone AM, Rosa AC, Nastri N, Santillán HD, Ariza Y, Iovannitti CA, et al. Genetic-relatedness of peri-implants and buccal *Candida albicans* isolates determined by RAPD-PCR. *Acta Odontol Lat.* 2016;29(3):197–200.
- Bilhan H, Sulun T, Erkose G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O, et al. The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clin Oral Investig.* 2009;13(4):363-368.
- Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(5):7922-7929.
- Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res.* 2005;84(1):9–20.
- Bowers RR, Lane MD. A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development. *Cell Cycle.* 2007;6(4):385–389.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003;423(6937):337-342.
- Brånemark PI. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 1977;16:1-132
- Brånemark PI. Tissue-integrated prostheses. *Quintessence.* 1985;99-115.
- Bravo-Pérez M, Almerich-Silla JM, Canorea-Díaz E, Casals-Pedró E, Cortés-Martínez FJ, Expósito-Delgado A, et al. Encuesta de Salud Oral en España. *RCOE* 2020;25:22-23.



- Bullon P, Fioroni M, Goteri G, Rubini C, Battino M. Immunohistochemical analysis of soft tissues in implants with healthy and peri-implantitis condition, and aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(5):553–559.
- Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010;6(6):2307-2313.
- Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459(7247):657–662.
- Campos MI, dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A) gene polymorphism. *Implant Dent.* 2004;13(1):95-101.
- Campos MI, Godoy dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. *Implant Dent.* 2005;14(4):391-396.
- Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Soldini C, Mazzocco F, Peñarrocha M, Covani, U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):426-434.
- Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Covani U, Rossetti PHO. Microbiologic and clinical findings of implants in healthy condition and with peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(4):834–842.

- Canullo L, Tallarico M, Radovanovic S, Delibasic B, Covani U, Rakic M. Distinguishing predictive profiles for patient-based risk assessment and diagnostics of plaque induced, surgically and prosthetically triggered peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(10):1243-1250.
- Capaldo CT, Beeman N, Hilgarth RS, Nava P, Louis NA, Naschberger E, et al. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -induced GBP-1 inhibits epithelial cell proliferation through suppression of  $\beta$ -catenin/TCF signaling. *Mucosal Immunol.* 2012;5(6):681-690.
- Capestany CA, Tribble GD, Maeda K, Demuth DR, Lamont RJ. Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2008;190(4):1436–1446.
- Carlsson J. Presence of various types of non-hemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. *Odontol Revy.* 1967;18(1):55-74.
- Carlsson JH, Grahn GJ, Wikner S. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol.* 1970;15(12):1143-1148.
- Carr BR, Boggess WJ, Coburn JF, Rekawek P, Chuang SK, Panchal N et al. Does alcohol consumption protect against late dental implant failures?. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2021;131(6):631-637.
- Carraro JJ, Dizner B, Alonso C. Exfoliative cytology in inflammatory gingival lesions. *Rev Asoc Odon Arg.* 1965;53(11):374-376.
- Casado PL, Aguiar DP, Costa LC, Fonseca MA, Vieira TC, Alvim-Pereira CC et al. Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 2013;51(6):353-358.

- Casado PL, Pereira MC, Duarte ME, Granjeiro JM. History of chronic periodontitis is a high risk indicator for peri-implant disease. *Braz Dent J.* 2013;24(2):136–141.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89:S1-S8.
- Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury AA, da Silva WJ, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofoul.* 2016;32(2):123–134.
- Cecilia EC, Myriam AK, María EL. Cytological analysis of the periodontal pocket in patients with aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Contemp Clin Den.* 2014;5(4):495-500.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001;183(18):5385–5394.
- Chang M, Wennström JL. Soft tissue topography and dimensions lateral to single implant-supported restorations. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(5):556–562.
- Chang M, Wennström JL, Odman P, Andersson B. Implant supported single-tooth replacements compared to contralateral natural teeth. Crown and soft tissue dimensions. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(3):185–194.

- Charalampakis G, Leonhardt Å, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study. *Clin Oral Impl Res.* 2012;23(9):1045-1054.
- Chattopadhyay T, Singh RR, Gupta S, Surolia A Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) augments insulin sensitivity in mice with type II diabetes mellitus by potentiating PI3K/AKT pathway. *Biofactors.* 2017;43(2):195–209.
- Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, Duncan MJ. Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2004;186(16):5473–5479.
- Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, Kwon B, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2179–2188.
- Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pintea-Simon IA, Man A. Candida and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganism.* 2020;8(6):857. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):S131-S139.
- Cobo F, Rodríguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martínez L, Navarro-Marí JM. Candida prosthetic joint infection. A review of treatment methods. *J Bone Joint Inf.* 2017;2(2):114-121.

- Coelho RB, Gonçalves Junior R, Villas-Boas RDM, Bonato LL, Quinelato V, Pinheiro ADR et al. Haplotypes in BMP4 and FGF genes increase the risk of peri-implantitis. *Braz Dent J.* 2016;27(4):367-374.
- Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LOO, Ferreira SD, Silva GL, Costa JEE. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. *J Clin Periodontol.* 2012;39(2):173–181.
- Cosyn J, Christiaens V, Koningsveld V, Coucke PJ, De Coster P, De Paepe A et al. An Exploratory Case-Control Study on the Impact of IL-1 Gene Polymorphisms on Early Implant Failure. *Clin Implants Dent Rel Res.* 2016;18(2):234-240.
- Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98(13):3534–3540.
- Cury PR, Horewicz VV, Ferrari DS, Brito R Jr, Sendyk WR, Duarte PM et al. Evaluation of the effect of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism on the risk of peri-implantitis: a case-control study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(6):1101-1115.
- Cury PR, Joly JC, Freitas N, Sendyk WR, Nunes FD, de Araújo NS. Effect of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphism on Peri-Implant Bone Loss Following Prosthetic Reconstruction. *Implant Dent.* 2007;16(1):80-88.
- Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(10):2515–2532.

- Dalago HR, Schuldt Filho G, Rodrigues MAP, Renvert S, Bianchini MA. Risk indicators for peri-implantitis. A cross-sectional study with 916 implants. *Clin Oral Implant Res.* 2017;28(2):144-150.
- Danser MM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants. *J Periodontol.* 1997;68(3):209-216.
- Daubert DM, Weinstein BF, Bordin S, Leroux BG, Flemming TF. Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: a cross-sectional analysis. *J Periodontol.* 2015;86(3):337–347.
- Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003;67(8):932–949.
- de Araujo Nobre M, Mano Azul A, Rocha E, Malo P. Risk factors of peri-implant pathology. *Eur J Oral Sci.* 2015;123(3):131–139.
- De Bernardis F, Mondello F, San Millan R, Ponton J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3481–3486.
- de Boever AL, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implant Res.* 2006;17(1):8-17.
- de Brandao ML, Vettore MV, Vidigal Junior GM. Peri-implant bone loss in cement- and screw-retained prostheses: systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2013;40(3):287–295.

- DeCarlo AA, Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*. 1997;76(6):1260–1270.
- de la Torre J, Quindós G, Marcos-Arias C, Marichalar-Mendia X, Gainza ML, Eraso E et al. Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(3):134-139.
- del Valle AE, López-Vicente J, Martínez-Conde R, Aguirre-Zorzano LA. Current understanding of genetic polymorphisms as biomarkers for risk of biological complications in implantology. *J Clin Exp Dent*. 2018;10(10):e1029- e1039.
- Dereka X, Mardas N, Chin S, Petrie A, Donos N. A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(7):775–788.
- Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: prevalence of peri-implantitis. *J Dent Res*. 2016;95(1):43–49.
- Derks J, Schaller D, Hakansson J, Wennstrom JL, Tomasi C, Berglundh T. Peri-implantitis-onset and pattern of progression. *J Clin Periodontol*. 2016;43(4):383–388.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–550.

- Diniz-Freitas M, García-García A, Crespo-Abelleira A, Martins-Carneiro JL, Gándara-Rey JM. Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. *Med Oral*. 2004;9(4):355-361.
- Dirschnabel AJ, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Bernardino JF, Rosa EA, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B(C-511T) polymorphism with dental implant loss and the clusterization phenomenon. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(11):1235-1241.
- Doetzer AD, Schlipf N, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Werneck R, Riess O et al. Lactotransferrin Gene (LTF) Polymorphisms and Dental Implant Loss: A Case-Control Association Study. *Clin Implant Dent Rel Res*. 2015;17:e550-e561.
- Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;187(2):139–144.
- Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *J Periodontol Res*. 2018;53(5):657-681.
- Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2007;5(12):1095-1100.
- dos Santos MC, Campos MI, Souza AP, Scarel-Caminaga RM, Mazzonetto R, Line SR. Analysis of the transforming growth factor-beta 1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Implant Dent*. 2004;13(3):262-269.



- Eick S, Pfister W. Efficacy of antibiotics against period-ontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol.* 2004;75(10):1327–1334.
- Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis.* 2011;7(1):11-17.
- Endo H, Rees TD, Kuyama K, Matsue M, Yamamoto H. Use of oral exfoliative cytology to diagnose desquamative gingivitis: A pilot study. *Quintessence Int.* 2008;39(4):e152-e161.
- Eriksson AR, Albrektsson T, Albrektsson B. Heat caused by drilling cortical bone. Temperature measured in vivo in patients and animals. *Acta Orthop Scand.* 1984;55(6):629–631.
- Esfahanizadeh N, Daneshparvar N, Motallebi S, Akhondi N, Askarpour F, Davaie S. Do we need keratinized mucosa for a healthy peri-implant soft tissue? *Gen Dent.* 2016;64(4):51–55.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):721–764.
- Estefanía-Fresco R, García-de-la-Fuente AM, Egaña-Fernández-Valderrama A, Bravo M, Aguirre-Zorzano LA. One-year results of a nonsurgical treatment protocol for peri-implantitis. A retrospective case series. *Clin Oral Implant Res.* 2019;30(7):702-712.
- Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002585.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>

- Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Bürgin W, Brägger U, Buser D, Duf GW, Kornman KS. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for periimplant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implant Res.* 2003;14(1):10–17.
- Fernandes MS, Vaz P, Braga AC, Fernandes JCS, Figueiral MH. The role of IL-1 gene polymorphisms (IL1A, IL1B, and IL1RN) as a risk factor in unsuccessful implants retaining overdentures. *J Prosth Res.* 2017;61(4):439-449.
- Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. *Clin Oral Investig.* 2009;13(2):237-242.
- Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol.* 2006;33(12):929–935.
- Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2012;9(2):109-118.
- Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Res Int.* 2015;15:421746. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>
- Forster F, Paster W, Supper V, Schatzlmaier P, Sunzenauer S, Ostler N, et al. Guanylate binding protein 1–mediated interaction of T cell antigen receptor signaling with the cytoskeleton. *J Immunol.* 2014;192(2):771–781.
- Fu XH, Meng FL, Hu Y, Zhou JQ. *Candida albicans*, a distinctive fungal model for cellular aging study. *Aging Cell.* 2008;7(5):746–757.

- Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implant Res.* 2007;18(4):501-508.
- Gamper FB, Benic GI, Sanz-Martin I, Asgeirsson AG, Hämmerle CH, Thoma DS. Randomized controlled clinical trial comparing one-piece and two-piece dental implants supporting fixed and removable dental prostheses: 4-to 6-year observations. *Clin Oral Implant Res.* 2017;28(12):1553-1559.
- García-Delaney C, Sánchez-Garcés MÁ, Figueiredo R, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Clinical significance of interleukin-1 genotype in smoking patients as a predictor of peri-implantitis: A case-control study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20(6):e737-e743.
- Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2013;62(1):59-94.
- Gill GW. Papanicolaou Stain. Cytopreparation. In *Essentials in Cytopathology* 2013;12:143–189.
- Gobbato L, Avila-Ortiz G, Sohrabi K, Wang CW, Karimbux N. The effect of keratinized mucosa width on peri-implant health: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2013;28(6):1536–1545.
- Gobierno Vasco. Informe anual del desarrollo del Decreto 118/90 sobre asistencia dental a la población infantil de la C.A.P.V. Gobierno Vasco (Vitoria-Gasteiz), 2019.
- Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psych.* 2009;70(8):1078–1090.

- Gomes JA, Sartori IA, Able FB, de Oliveira Silva TS, do Nascimento C. Microbiological and clinical outcomes of fixed complete-arch mandibular prostheses supported by immediate implants in individuals with history of chronic periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(6):734–741.
- Gómez-Molero E, De-la-Pinta I, Fernández-Pereira J, Groß U, Weig M, Quindós G et al. *Candida parapsilosis* colony morphotype forecasts biofilm formation of clinical isolates. *J Fungi.* 2021;7(1):33. <https://doi.org/10.3390/jof7010033>
- Goulley J, Dahl U, Baeza N, Mishina Y, Edlund H. BMP4-BMPRI1A signaling in beta cells is required for and augments glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab.* 2017;5(3):207–219.
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003;74(3):391-401.
- Graves DT, Valentin-Opran A, Delgado R. The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connective Tissue Res.* 1989;23(2-3):209-218.
- Grayson R, Douglas CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol.* 2003;30(6):542–550.
- Greenfield EJ. Implantation of artificial crown and bridge abutments. *Int J Oral Implant.* 1991;7(2):63–68.
- Groeger S & Meyle J. Oral mucosal epithelial cells. *Front Immunol.* 2019;10:208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00208>

- Gruica B, Wang HY, Lang NP, Buser D. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Implant Res.* 2004;15(4):393–400.
- Gualini F, Berglundh T. Immunohistochemical characteristics of in-flammatory lesions at implants. *J Clin Periodontol.* 2003;30(1):14–18.
- Guimarães JM, Guimarães IC, Duarte ME, Vieira ME, Vieira T, Vianna VF, et al.. Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 gene are associated with fracture non-union. *J Orthop Res.* 2013;31(12):1971-1979.
- Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, Shah VO, Balakrishnan VS, Guzman NJ, Girndt M. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol Cjasn.* 2012;7(12):1938–1946.
- Gurul C, Kazazoglu E, Dabakoglu B, Korachi M. A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2011;26(5):955–960.
- Guven Y. Scientific basis of dentistry. *J Istanbul Uni Fac Dent.* 2017;51(3):64-71.
- Hamdy AAEMM, Ebrahim MAEM. The Effect of Interleukin-1 Allele 2 Genotype (IL-1a– 889 and IL-1b+ 3954) on the Individual's Susceptibility to Peri-Implantitis: Case-Control Study. *J Oral Implant.* 2011;37(3):325-334.
- Han G, Li F, Singh TP, Wolf P, Wang XJ. The pro-inflammatory role of TGFβ1: a paradox? *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):228-235.

- Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10(2):115-122.
- Haynes, K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2001;9(12):591–596.
- He K, Jian F, He T, Tang H, Huang B, Wei N. Analysis of the association of TNF- $\alpha$ , IL-1A, and IL-1B polymorphisms with peri-implantitis in a Chinese non-smoking population. *Clin Oral Inves*. 2020;24(2):693-699.
- Heitz-Mayfield LJ, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(20):S237-S245.
- Heitz-Mayfield LJ, Schmid B, Weigel C. Does excessive occlusal load affect osseointegration? An experimental study in the dog. *Clin Oral Implant Res*. 2004;15(3):259–268.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Fröhlich KU, Wissing S et al. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. 2004;164(4):501–507.
- Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene*. 2006;25(51):6706–6716.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000;15(1):2–12.
- Holland SM, Vinh D. Yeast infections--human genetics on the rise. *NEJM*. 2009;361(18):1798-1801.

- Honkala AT, Tailor D, Malhotra SV. Guanylate-binding protein 1: an emerging target in inflammation and cancer. *Front Immunol.* 2020;10:3139.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.0313>
- Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: A review of als protein structure and Function. *Front Microbiol.* 2016;7:280.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00280>
- Huang L, Chen R, Liu L, Zhou Y, Chen Z. Lactoferrin ameliorates pathological cardiac hypertrophy related to mitochondrial quality control in aged mice. *Food Funct.* 2020;12(16):7514-7526.
- Huang GT, Haake SK, Kim JW, Park NH. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol.* 1998;13(5):301–309.
- Huang GT, Kim D, Lee JK, Kuramitsu HK, Haake SK. Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. *Infect Immun.* 2001;69(3):1364–1372.
- Huang GT, Zhang HB, Dang HN, Haake SK. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog.* 2004;37(6):303–312.
- Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LÅ, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implant Res.* 2012;13(4):349-358.

Imbert C, Rammaert B. What Could Be the Role of Antifungal Lock-Solutions? From Bench to Bedside. *Pathogens*. 2018;7(1):6.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens7010006>.

Insua A, Monje A, Wang HL, Miron RJ. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J Biomed Mat Res*. 2017;105(7):2075-2089.

Ivanovski S, Lee R. Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):116-130.

Jansson H, Hamberg K, De Bruyn Odont H, Odont GB. Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. *Clin Implants Dent Rel Res*. 2005;7(1):51-59.

Jaworska-Zaremba M, Mierzwińska-Nastalska E, Łomżyński L, Popko K, Wąsik M. Analysis of genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene in the implantoprosthesis group of patients – preliminary studies. *Centr Eur J Immunol*. 2008;33(2):74-77.

Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: Managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(16):S152-S157.

Ji S, Kim Y, Min BM, Han SH, Choi Y. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*. 2007;42(6):503–510.



- Jolley KA, Wilson DJ, Kriz P, McVean G, Maiden MC. The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol*. 2005;22(3):562–569.
- Jones SJ. A special relationship between spherical and filamentous microorganisms in mature human dental plaque. *Archs Oral Biol*. 1972;17(3):613-616.
- Johnson JD, Chen R, Lenton PA, Zhang G, Hinrichs JE, Rudney JD. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2008;79(12):2305–2312.
- Ju HM, Ahn YW, Jeong SH, Jeon HM, Kim KH, Song BS, Ok SM. Characteristics of patients who perceive dental treatment as a cause of oral mucosal lesions. *J Oral Sci*. 2019;61(3):468–474.
- Junior RG, Pinheiro AR, Schoichet JJ, Nunes CHR, Gonçalves R, Bonato LL et al. MMP13, TIMP2 and TGFB3 gene polymorphisms in Brazilian subjects with chronic periodontitis and periimplantitis. *Braz Dent J*. 2016;27(2):128-134.
- Kadkhodazadeh M, Alizadeh Tabari Z, Ardakani MRT, Ebadian AR, Brook A. Analysis of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in Iranian patients with chronic periodontitis and peri-implantitis. A cross-sectional study. *Eur J Oral Implant*. 2012;5(4):381-388.
- Kadkhodazadeh M1, Amid R, Ebadian AR, Shams E, Tamizi M. TRAF family member-associated NF-KB activator (TANK) gene polymorphism in chronic periodontitis and peri-implantitis patients. *J Long Term Eff Med Implant*. 2012;22(2):127-136.

- Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Amid R, Zarnegarnia P, Mollaverdi F, Aghamohammadi N. Natural resistance associated macrophage protein 1 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis not peri-implantitis in an Iranian population: A cross sectional study. *Acta Med Iran*. 2016;54(5):323-329.
- Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Arch Oral Biol*. 2013;58(5):530-536.
- Kamekura R, Nava P, Feng M, Quiros M, Nishio H, Weber DA et al. Inflammation-induced desmoglein-2 ectodomain shedding compromises the mucosal barrier. *Mol Biol Cell*. 2015;26(18):3165–3177.
- Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics* 2015;8(1):37. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
- Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Bragger U, Hammerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res*. 2003;14(3):329–339.
- Kaufmann SH. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med*. 2005;353(23):2423-2426.
- Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*. 2006;169(3):987-998.

- Kawano H, Nakatani T, Mori T, Ueno S, Fukaya M, et al. (2004). Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins, BRINP family. *Mol Brain Res.* 2004;125(1-2):60-75.
- Kilic K, Koc AN, Tekinsen FF, Yildiz P, Kilic D, Zararsiz G, Kilic E. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in bar-and locator-retained overdentures. *J Implantol.* 2014;40(5):549–556.
- Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN- $\gamma$ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science.* 2011;332(6030):717–721.
- Knoke M, Bernhardt H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses* 2006;49(4):283-287.
- Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res.* 2009;88(8):741-745.
- Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol.* 2010;81(2):231–238.
- Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol.* 2011;38(3):285-292.
- Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM: Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(2):188–193.

- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999;402(6759):304–309.
- Konttinen YT, Lappalainen R, Laine P, Kitti U, Santavirta S, Teronen O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006;26(2):135–141.
- Koss L. *Diagnostic Cytology*. JB Lippincott Co (Philadelphia).1961;15.
- Kordbacheh Changi K, Finkelstein J, Papapanou PN. Peri-implantitis prevalence, incidence rate, and risk factors: A study of electronic health records at a US dental school. *Clin Oral Implant Res*. 2019;30(4):306-314.
- Kozlovsky A, Tal H, Laufer BZ. Impact of implant overloading on the peri-implant bone in inflamed and non-inflamed peri-implant mucosa. *Clin Oral Implant Res*. 2007;18(5):601–610.
- Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: Pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002;50(4):243–260.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002;70(2):878–888.
- Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol*. 1990;144(11):4226-4230.

- Lachmann S, Kimmerle-Müller E, Axmann D, Scheideler L, Weber H, Haas R. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A-889 and IL-1B+ 3954 genotype: a cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. *Clin Oral Implant Res.* 2007;18(2):212–223.
- Ladeira-Casado P, Villas-Boas R, de Mello W, Leite Duarte ME, Mauro Granjeiro J. Peri-implant disease and chronic periodontitis: is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a Brazilian population? *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2013; 28(1):35-43.
- Ladwein C, Schmelzeisen R, Nelson K, Fluegge TV, Fretwurst T. Is the presence of keratinized mucosa associated with periimplant tissue health? A clinical cross-sectional analysis. *Int J Implant Dent.* 2015;1(1):11. <https://doi.org/10.1186/s40729-015-0009-z>.
- Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Setien-Olarra A, Aguirre-Urizar JM, Marichalar-Mendia X. Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis. *Int J Implant Dent.* 2022;8(1):1-9.
- Laine ML, Leonhardt Å, Roos-Jansåker AM, Peña AS, Van Winkelhof AJ, Winkel EG, Renvert S. IL-1RN gene polymorphism is associated with periimplantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(4):380–385.
- Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 1995;63(10):3878–3885.
- Landegren U, Nilsson M, Kwok PY. Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 1998;8(8):769–776.

- Lang NP, Berglundh T. Working Group 4 of the Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011;38(11):178-181.
- Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment Note. *Clin Oral Implant Res*. 2000;11(1):146-155.
- Lange D. Comparative histologic and cytologic studies on the human gingival marginal tissue. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1965;20:1035-1047.
- Lancy Jr P, Appelbaum B, Holt SC, Rosan B Quantitative in vitro assay for “corncob” formation. *Inf Inmun*. 1980;29(2):663-670.
- Lange D. Vergleichende Histologische und Zytologische Untersuchungen am Menschlichen Gingivalsaum. *Deutsch. Zahnartzl. Ztschrift*. 1967;20:67.
- Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WM, Macpherson LM. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2007;34(4):271-277.
- Lauren Bach JM, Epstein JB. Treatment strategies for oropharyngeal candidiasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(9):1413–1421.
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2017;62:1-12.
- Lekholm U, Adell R, Lindhe J, Brånemark PI, Eriksson B, Rockler B et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures:(II) A cross-sectional retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1986;15(1):53-61.

- Leonhardt Å, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(5):339–345.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(3):S140-S146.
- Lin YH, Huang P, Lu X, Guan DH, Man Y, Wei N, Gong P. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2340–2344.
- Lin SJ, Austriaco N. Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2014;14(1):119–135.
- Lin GH, Chan HL, Wang HL. The significance of keratinized mucosa on implant health: a systematic review. *J Periodontol.* 2013;84(12):1755–1767.
- Lin YH, Huang P, Lu X, Guan DH, Man Y, Wei N, Gong P. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2340–2344.
- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease.* *New Engl J Med.* 2000;343(16):1139–1147.
- Lindhe J, Meyle J, Group DoO WoP. Peri-implant diseases: consensus report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):282–285.

- Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implant Res.* 1996;7(4):329–336.
- Lionakis MS, Netea MG. Candida and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog.* 2013;9(1):e1003079.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003079>
- Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 1999;70(4):431-437.
- Listgarten MA, Mayo H, Amsterdam M. Ultrastructure of the attachment device between coccal and filamentous microorganisms in “corn cob” formations of dental plaque. *Archs Oral Biol.* 1973;18(5):651-675.
- Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med.* 2002;11(1):17–22.
- Lucchese A, Scivetti M, Giuliani M, Lajolo C, Serpico R, Favia G. Cellular populations of periimplant tissues: cytological analysis with sulcular microbrushing. *Implant Dent.* 2014;23(1):98-102.
- Lukas JR, Pastor RF. Activity-Induced Patterns of Dental Abrasion in Prehistoric Pakistan: Evidence From Mehrgarh and Harappa. *Am J Phys Anthropol.* 1988;76(3):377–398.



- McCourtie J, MacFarlane TW, Samaranayake LP. A comparison of the effects of chlorhexidine gluconate, amphotericin B and nystatin on the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *J Antimicrob Chemother.* 1986;17(5):575–583.
- MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 1997;24(10):753-760.
- Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*; 2003;316:23-32.
- Mark HB, Roberts SP. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (18 Edition). Merck Sharp & Dohme Corp (Kenilworth), 2016.
- Marchetti A. Biographic and personal recollections of George Papanicolaou. *Obst Gynec Survey.* 1969;24(7):680-684.
- Marrone A, Lasserre J, Bercy P, Brex MC. Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. *Clin Oral Implant Res.* 2013;24(8):934-940.
- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol.* 2003;149(2):279–294.
- Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br J Haematol.* 1999;106(1):167-170.
- Máximo MB, de Mendonca AC, Alves JF, Cortelli SC, Peruzzo DC, Duarte PM. Peri-implant diseases may be associated with increased time loading and generalized periodontal bone loss: preliminary results. *J Oral Implantol.* 2008;34(5):268–273.

- Mba IE, Nweze EI. Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis*. 2020;39(10):1797–1819.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771-776.
- Melo RF, Lopes BM, Shibli JA, Marcantonio Junior E, Marcantonio RAC, Galli GMT. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 expression and gene polymorphisms in subjects with peri-implant disease. *Clin Implants Dent Relat Res*. 2012;14(6):905–914.
- Mencio F, De Angelis F, Papi P, Rosella D, Pompa G, Di Carlo S. A randomized clinical trial about presence of pathogenic microflora and risk of peri-implantitis: comparison of two different types of implant-abutment connections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(7):1443–1451.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(11):1699-1707.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psych*. 2009;65(9):732–741.
- Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rec*. 2009;22(2):240-273.
- Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004;83(2):166–169.

- Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-Garcia F, Monteoliva L, Pla J, Gil C et al. *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol*. 1998;1(12):95–106.
- Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implant Res*. 2012;23(6):67-76.
- Monje A, Wang HL, Nart J. Association of preventive maintenance therapy compliance and peri-implant diseases: a cross-sectional study. *J Periodontol*. 2017;88(10):1030–1041.
- Montes CC, Alvim-Pereira F, De Castilhos BB, Sakurai MLL, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B (C+ 3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(2):208-217.
- Moonen CG, de Vries TJ, Rijkschroeff P, Poubelle PE, Nicu EA, Loos BG. The possible role of neutrophils in the induction of osteoclastogenesis. *J Immunol Res*. 2019; 2019:8672604. <https://doi.org/10.1155/2019/8672604>
- Moralis A, Kunkel M, Reichert TE, Kosmehl H, Driemel O. Identification of a recurrent oral squamous cell carcinoma by brush cytology. *Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie: MKG*. 2007;11(6):355-358.
- Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature*. 2016;532(7597):64–68.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003;67(3):400–428.

- Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1989;4(4):321–326.
- Nakou M, Mikx FHM, Oosterwaal PJM, Kruijssen JCWM. Early microbial colonization of permucosal implants in edentulous patients. *J Dent Res.* 1987;66(11):1654-1657.
- Naot D, Grey A, Reid IR, Cornish J. Lactoferrin—a novel bone growth factor. *Clin Med Res.* 2005;3(2):93-101.
- Neale MN, Glass KA, Longley SJ, Kim DJ, Laforce-Nesbitt SS, Wortzel JD et al. Role of the inducible adhesin CpAls7 in binding of *Candida parapsilosis* to the extracellular matrix under fluid shear. *Inf Immun.* 2018;86(4):e00892-e00917.
- Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou F, Sellami H, et al. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):67. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0376-2>
- Olmedo DG, Nalli G, Verdú S, Paparella ML, Cabrini R. Exfoliative Cytology and Titanium Dental Implants: A Pilot Study. *J Periodontol.* 2013;84(1):78-83.
- Osborn JF, Newesely H. Dynamic aspects of the implantbone interface. In: Heimke G, ed. *Dental implants: materials and systems.* München: Carl Hanser Verlag, 1980:111-123.
- Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis. *Front Immunol* 2014;5:48. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>

- Oxilia G, Peresani M, Romandini M, Matteucci C, Spiteri CD, Henry AG, Boscatto P. Earliest evidence of dental caries manipulation in the Late Upper Palaeolithic. *Sci Rep.* 2015;5(1):1-10.
- Padial-Molina M, López-Martínez J, O'Valle F, Galindo-Moreno P. Microbial profiles and detection techniques in peri-implant diseases: a systematic review. *J Oral Maxillofac Res.* 2016;7(3):e10. <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7310>
- Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss J.M. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(5):e206–e216.
- Pannanusorn S, Ramirez-Zavala B, Lunsdorf H, Agerberth B, Morschhauser J, Romling U. Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell.* 2014;13(4):438–451.
- Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans* 1. *J Prosthodont* 2003;12(4), 249-254.
- Parpaiola A, Cecchinato D, Toia M, Bressan E, Speroni S, Lindhe J. Dimensions of the healthy gingiva and peri-implant mucosa. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(6):657–662.
- Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone.* 2008;43:(5)931-940.

- Patton LL, Epstein JB, Kerr AR. Técnicas adyuvantes en la exploración del cáncer oral y diagnóstico de lesiones. Una revisión sistemática de la literatura. *J Am Dent Assoc.* 2008;3(5):234-244.
- Pauk M, Bordukalo-Niksic T, Brkljacic J, Paralkar VM, Brault AL, Dumic-Cule I, et al. A novel role of bone morphogenetic protein 6 (BMP6) in glucose homeostasis. *Acta Diabetol.* 2019;56(3):365–371.
- Peñarrocha-Oltra D, Rossetti PH, Covani U, Galluccio F, Canullo L. Microbial leakage at the implant-abutment connection due to implant insertion maneuvers: cross-sectional study 5 years postloading in healthy patients. *J Oral Implantol.* 2015;41(6):e292–e296.
- Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Care JM. Development of Candida associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(2):86–94.
- Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2014;16(6):783-793.
- Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Comm Dent Oral Epid.* 2003;31(1):3-24.
- Petkovic-Curcin A, Zeljic K, Cikota-Aleksic B, Dakovic D, Tatic Z, Magic Z. Association of cytokine gene polymorphism with peri-implantitis risk. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2017;32(5):e241–e248.
- Perera N, Ritchie RH, Tate M. The Role of Bone Morphogenetic Proteins in Diabetic Complications. *ACS Pharmacol Translat Sci.* 2019;3(1):11-20.

- Phillips AJ, Crowe JD, Ramsdale M. Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(3):726–731.
- Polymeri A, Loos BG, Aronovich S, Steigmann L, Inglehart MR. Risk factors, diagnosis, and treatment of peri-implantitis: A cross-cultural comparison of US and European periodontists' considerations. *J Periodontol*. 2022;93(4):481-492.
- Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 1994;5(4):254-259.
- Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4(6):397–407.
- Potocki L, Kuna E, Filip K, Kasprzyk B, Lewinska A, Wnuk M. Activation of transposable elements and genetic instability during long-term culture of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Biogerontol*. 2019;20(4):457–474.
- Pryszcz LP, Nemeth T, Gacser A, Gabaldon T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol*. 2013;5(12):2382–2392.
- Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res*. 1993;72(9):1304–1309.

- Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of ‘pristine’ peri-implant pockets. *Clin Oral Implant Res.* 2006;17(1):25–37.
- Rakic M, Petkovic-Curcin A, Struillou X, Matic S, Stamatovic N, Vojvodic D. CD14 and TNF $\alpha$  single nucleotide polymorphisms are candidates for genetic biomarkers of peri-implantitis. *Clin Oral Inv.* 2015;19(4):791-801.
- Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yesat Tes.* 2006;6(7):979-986.
- Ramesh BL, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Devine A, Prince RL. Bone mass effects of a BMP4 gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone.* 2005;36(3):555-561.
- Rams TE, Link CC. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *Oral Implantol.* 1983;11(1):93-100.
- Rams TE, Roberts TW, Tatum H Jr, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. *J Prosthet Dent.* 1984;51(4):529-534.
- Reis MBL, Arid J, Flores EKB, Cruz GV, Marañón-Vásquez GA, Souza LKFD et al. Association between Genetic Polymorphisms in RANK, RANKL and OPG and Peri-Implant Diseases in Patients from the Amazon Region. *Braz Dent J.* 2020;31(1):63-68.
- Renvert S, Aghazadeh A, Hallstrom H, Persson GR. Factors related to peri-implantitis— a retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(4):522–529.



- Renvert S, Roos-Jansåker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of periimplant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8):305–315.
- Renvert S, Quirynen M. Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(11):15-44.
- Ribeiro R, Melo R, Tortamano Neto P, Vajgel A, Souza PR et al. Polymorphisms of IL-10 (-1082) and RANKL (-438) Genes and the Failure of Dental Implants. *Int J Dent*. 2017;2017:3901368. <https://doi.org/10.1155/2017/3901368>
- Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol*. 2011;187(9):4835–4843.
- Riegel A, Maurer T, Prior B, Stegmaier S, Heppert V, Wagner C, et al. Human polymorphonuclear neutrophils express RANK and are activated by its ligand, RANKL. *Eur J Immunol*. 2012;42(4):975-981.
- Ring Malvin E. *Dentistry: an illustrated history*. Abradale Press (Nueva York), 1985.
- Rinke S, Ohl S, Ziebolz D, Lange K, Eickholz P. Prevalence of periimplant disease in partially edentulous patients: a practice-based crosssectional study. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(8):826–833.
- Ritz, H. L. 1967. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch. Oral Biol*. 1956;12(12):1561-1568.

- Robinson K, Loughlin MF, Potter R, Jenks PJ. Host adaptation and immune modulation are mediated by homologous recombination in *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis.* 2005;191(4):579–587.
- Roccuzzo M, Bonino F, Aglietta M, Dalmaso P. Ten-year results of a three arms prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 2: clinical results. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(4):389–395.
- Roccuzzo M, De Angelis N, Bonino L, Aglietta M. Ten-year results of a three-arm prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 1: implant loss and radiographic bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(5):490–496.
- Roccuzzo M, Grasso G, Dalmaso P. Keratinized mucosa around implants in partially edentulous posterior mandible: 10-year results of a prospective comparative study. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(4):491–496.
- Rodrigo D, Sanz-Sánchez I, Figüero E, Llodrá JC, Bravo M, Caffesse RG, et al. Prevalence and risk indicators of peri-implant diseases in Spain. *J Clin Periodontol.* 2018;45(12):1510-1520.
- Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AE, Davies G, Henry PJ et al. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants?. *J Periodontal Res.* 2002;37(1):37-41.
- Rokn A, Aslroosta H, Akbari S, Najafi H, Zayeri F, Hashemi K. Prevalence of peri-implantitis in patients not participating in well-designed supportive periodontal treatments: a cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(3):314–319.

- Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using *hwp1* gene. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2008;62(2):230-233.
- Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol*. 2006;33(4):296–301.
- Rosa EAR, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, da Silva WJ, Yau JYY, et al. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 2008;57(10):1277–1281.
- Rosen P, Clem D, Cochran D, Froum S, McAllister B, Renvert S et al. Peri-implant mucositis and periimplantitis: A current understanding of their diagnoses and clinical implications. *J Periodontol*. 2013;84(4):436-443.
- Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res*. 1991;2(3):135-144.
- Rossignol T, Ding C, Guida A, d'Enfert C, Higgins DG, Butler G. Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(4):550–559.
- Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, dos Santos JD, de Barros PP, de Azevedo Prata MC et al. Competitive Interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0131700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131700>

- Rudney JD, Chen R. The vital status of human buccal epithelial cells and the bacteria associated with them. *Arch Oral Biol.* 2006;51(4):291–298.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res.* 2005;84(1):59–63.
- Rusu M, Carlan M, Scantei V, Socolovschi M Some aspects of oral exfoliative cytology in marginal periodontal disease. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1973;16(1):61-80.
- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(2):e139-e143.
- Salvi GE, Fürst MM, Lang NP, Persson G. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Impl Res.* 2009;19(3):242-248.
- Saki Y, Calonius PEB, Sohlberg F. Cytological Atypia in Epithelial Cells of Saliva and Gingival Pockets in Relation to Inflammatory Processes of the Mouth. *Suon. Hammaslaak. Toim.* 1960;56:309.
- Sanz M, Alandez J, Lazaro P, Calvo JL, Quirynen M, van Steenberghe D. Histopathologic characteristics of peri-implant soft tissues in Branemark implants with 2 distinct clinical and radiological patterns. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(3):128–134.

- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2008;62(1):10–24.
- Saumann A. Los orígenes del Papanicolaou. *Rev Chil Obst Ginecol.* 1992;57(6):461-463.
- Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2005;48(6):365–377.
- Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hansch GM, Filler SG et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiol.* 2015;161(1):168–181.
- Schulz TJ, Tseng YH Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;20(5–6):523–531.
- Schwarz F, Becker K, Sahm N, Horstkemper T, Rousi K, Becker J. The prevalence of peri-implant diseases for two-piece implants with an internal tube-in-tube connection: a cross-sectional analysis of 512 implants. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(1):24–28.
- Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent.* 2015;1(1):1-9.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):S246-S266.
- Schwarz F, Hegewald A, Becker J. Impact of implant-abutment connection and positioning of the machined collar/microgap on crestal bone level changes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(4):417–425.

- Schwarz F, Hertzen M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(2):161–170.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1191–1197.
- Serino G, Strom C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(2):169–174.
- Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Smoking and the risk of peri-implantitis. A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implant Res.* 2015;26(4):e62-e67.
- Sheets SM, Potempa J, Travis J, Casiano CA, Fletcher HM. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. *Infect Immun.* 2005;73(3):1543–1552.
- Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis.* 2007;23(2):328–331.
- Shibli JA, Martins MC, Lotufo RFM, Marcantonio Jr E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2003;18(3):383-90.
- Shimono M, Ishikawa T, Enokiya Y, Muramatsu T, Matsuzaka KI et al. Biological characteristics of the junctional epithelium. *Microscopy.* 2003;52(6):627-639.

- Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):423–429.
- Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, Furberg CD, Psaty BM. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation.* 2003;107(1):87–92.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2011;19(5):241–247.
- Singh DK, Németh T, Papp A, Tóth R, Lukácsi S, Heidingsfeld O et al. Functional characterization of secreted aspartyl proteases in *Candida parapsilosis*. *mSphere.* 2019;4(4):e00484-e00519.
- Smith A, Krishnan L, Stein LD. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Genome Res.* 2005;15(11):1592–1593.
- Smith PW, Watkins K, Hewlett A. Infection control through the ages. *A J Inf Control.* 2012;40(1):35-42.
- Sokos D, Everts V, De Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Perio Res.* 2015;50(2):152-159.
- Sørensen MG, Henriksen K, Schaller S, Henriksen DB, Nielsen FC, Dziegiel MH et al. Characterization of osteoclasts derived from CD14<sup>+</sup> monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Min Met.* 2007;25(1):36-45.

- Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest.* 2013;42(7):555-622.
- Souza AB, Tormena M, Matarazzo F, Araujo MG. The influence of peri-implant keratinized mucosa on brushing discomfort and peri-implant tissue health. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(6):650–655.
- Sotorra-Figuerola D, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Parra-Pérez C, Aguirre-Urizar JM. Histopathological analysis of biopsies of “peri-implant inflammatory lesions.” Everything is not what it seems. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2020;22(3):366-372.
- Sridhar S, Abidi Z, Wilson TG Jr. In vitro evaluation of the effects of multiple oral factors on dental implants surfaces. *J Oral Implantol.* 2016;42(3):248–257.
- Stahl SS. The use of oral exfoliative cytology in evaluating periodontal health. *J Periodontol.* 1967;38(6P2):736-740.
- Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF. The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(4):11–17.
- Staubli N, Walter C, Schmidt JC, Weiger R, Zitzmann NU. Excess cement and the risk of peri-implant disease-a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(10):1278–1290.
- Steenberghe DV, Quirynen M, Naert I, Maffei G, Jacobs R. Marginal bone loss around implants retaining hinging mandibular overdentures, at 4-, 8-and 12-years follow-up. *J Clin Periodontol.* 2001;28(7):628-633.



- Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(1):49-60.
- Strooker H, de Waal YCM, Bildt MM. Psychological risk indicators for peri-implantitis: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 2022;15(10):980-987.
- Takazoe I, Matsukubo T, Katow T. Experimental formation of "corn cob" in vitro. *J Dent Res.* 1976;57(2):384-387.
- Tam V, O'Brien-Simpson NM, Chen YY, Sanderson CJ, Kinnear B, Reynolds EC. The RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* inactivate the Th2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5. *Infect Immun.* 2009;77(4):1451–1458.
- Tamai R, Asai Y, Ogawa T. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2005;73(10):6290–6298.
- Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, Suzuki N, Katono T, Sato S, et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sci.* 2006;78(15):1733–1740.
- Tarnow DP. Increasing prevalence of peri-implantitis: how will we manage? *J Dent Res.* 2016;95(1):7-8.
- Tati S, Davidow P, McCall A, Hwang-Wong E, Rojas IG, Cormack B et al. *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal

candidiasis. PLoS Pathog. 2016;12(3):e1005522.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005522>

Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis.* 2008;14(3):191–203.

Tawil G, Younan R, Azar P, Sleilati G. Conventional and advanced implant treatment in the type II diabetic patient: surgical protocol and long-term clinical results. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2008;23(4):744–752.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289(5484):1504–1508.

Tetsch P, Schone V. Cytological studies of the gingiva in endosseous extension implantations. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1976;31(2):162-165.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):761–767.

Tietzel I, El-Haibi C, Carabeo RA. Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon- $\gamma$ . *PloS ONE.* 2009;4(8):e6499.  
<https://doi.org/10.1371/journal>

Tomasi C, Derks J. Clinical research of peri-implant diseases-quality of reporting, case definitions and methods to study incidence, prevalence and risk factors of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2012;39(12):207–223.

Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th

- European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol*. 2015;42(16):S1-S4.
- Tribble GD, Lamont RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontol 2000*. 2010;52(1):63-68.
- Trisi P, Berardini M, Falco A, Podaliri Vulpiani M, Perfetti G. Insufficient irrigation induces peri-implant bone resorption: an in vivo histologic analysis in sheep. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(6):696–701.
- Trisi P, Perfetti G, Baldoni E, Berardi D, Colagiovanni M, Scogna G. Implant micromotion is related to peak insertion torque and bone density. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(5):467–471.
- Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606–625.
- Ueno D, Nagano T, Watanabe T, Shirakawa S, Yashima A, Gomi K. Effect of the keratinized mucosa width on the health status of peri-implant and contralateral periodontal tissues: a cross-sectional study. *Implant Dent*. 2016;25(6):796–801.
- Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000828.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
- Urizar JMA. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*. 2022;19:17-21.
- Urzúa B, Hermsilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and

*Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Sabouraudia*. 2008;46(8):783-793.

Vallejo Aisa J. *Valoración diagnóstica y pronóstica de la citología oral en la enfermedad periimplantaria* [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, 2018.

Vaz P, Gallas MM, Braga AC, Sampaio-Fernandes JC, Felino A, Tavares P. IL1 gene polymorphisms and unsuccessful dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(12):1404-1413.

Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 1998;280(5366):1077–1082.

Wang IC, Ou A, Johnston J, Giannobile WV, Yang B, Fenno JC et al. Association between peri-implantitis and cardiovascular diseases: A case-control study. *J Periodontol*. 2022;93(5):633-643.

Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J*. 1998;43(1):160-166.

Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Inv*. 2005;115(2):282-290.

Weems J.J., Jr. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*. 1992;14(3):756–766.

- Wennstrom JL, Derks J. Is there a need for keratinized mucosa around implants to maintain health and tissue stability? *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(6):136-146.
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *Fems Microbiol Rev.* 2000;24(5):661–671.
- World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization (Genova), 2019.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>
- Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Cur Rev Musculoskel Med.* 2009;2(1):56-64.
- Wu X, Pan G, McKenna MA, Zayzafoon M, Xiong WC, McDonald JM. RANKL regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2005;20(1)107–116.
- Wu YM, Juo SH, Ho YP, Ho KY, Yang YH, Tsai CC. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. *J Periodontol Res.* 2009;44(3):418-424.
- Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol.* 2002;4(5):305–314.
- Yilmaz O, Young PA, Lamont RJ, Kenny GE. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiol.* 2003;149(9):2417–2426.

- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43(1):102–132.
- Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11535-11540.
- Yulis M, Quiros M, Hilgarth R, Parkos CA, Nusrat A. Intracellular Desmoglein-2 cleavage sensitizes epithelial cells to apoptosis in response to pro-inflammatory cytokines. *Cell Death Dis*.2018;9(3):389. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0380-9>
- Yun PL, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. *Infect Immun*. 2001;69(9):5650–5660.
- Zhang D, Chen L, Li S, Gu Z, Yan J. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun*. 2007;14(2):99-107.
- Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Res Int*. 2014;2014:16:284836. <https://doi.org/10.1155/2014/284836>
- Zhang Y, Wang T, Chen W, Yilmaz O, Park Y, Jung IY, Hackett M, Lamont RJ. Differential protein expression by *Porphyromonas gingivalis* in response to secreted epithelial cell components. *Proteomics*. 2005;5(1):198–211.

Zhou J, Zhao Y. Osteoprotegerin Gene (OPG) Polymorphisms Associated with Peri-implantitis Susceptibility in a Chinese Han Population. *Med Sci Monit.* 2016;22:4271-4276.

Zhu Z, Shi Z, Yan W, Wei J, Shao D, Deng X, et al. Nonstructural protein 1 of influenza A virus interacts with human guanylate-binding protein 1 to antagonize antiviral activity. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e55920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055920>

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):286-291.





## 8. ABREVIATURAS

a.C.: antes de Cristo

ADN: *Ácido desoxirribonucleico*

ADR: Adrenoceptor

AUC: *Area under the curve* Área bajo la curva

BMP: *Bone Morphogenetic Protein* Proteína morfogenética ósea

BOP: *Bleeding on probing* Sangrado al sondaje

BRAF: *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B* Homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf

BRINP: *BMP/retinoic acid inducible neural specific* BMP/ácido retinoico inducible neural específico 3

CAPV: Comunidad Autónoma del País Vasco

CD: *Cluster of differentiation* Grupo de diferenciación

CEISH: Comité de Ética de Investigación con Seres Humanos

CEIAB: Comité de Ética de Investigación con Agentes Biológicos

CHST: Carbohidrato sulfotransferasa

COL: Colágeno

COMQ: Centro Odontológico Médico-Quirúrgico

COMT: Catecol O-metiltransferasa

d.C.: después de Cristo

DROSHA: Clase 2 ribonucleasa III

DRD2: *Dopamine receptor D<sub>2</sub>* Receptor de dopamina D<sub>2</sub>

DS: Desviación estándar

ENPP: *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase* Pirofosfatasa/fosfodiesterasa de ectonucleótidos

ESR: *Estrogen receptor* Receptor de estrógeno

FGF: *Fibroblastic growth factor* Factor de crecimiento fibroblástico

GBP: *Guanylate-binding protein* Proteína de unión al guanilato

GCA: Grupo Caso

GCO: Grupo Control

GDF: *Growth differentiation factor* Factor diferenciador de crecimiento

GFR: *Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor* Receptor del factor neurotrófico derivado de células gliales

HbA1c: Hemoglobina glicosilada

HTR: *HT serotonin receptor* Receptor de serotonina HT

IC: Intervalo de confianza

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

IKK: *IκB kinase* IκB quinasa

JAK: *Janus kinase* Janus quinasa

JNK: *c-Jun N-terminal kinase* c-Jun N-terminal quinasa

KCNS: *Potassium voltage-gated channel subfamily S* Subfamilia S del canal dependiente de voltaje de potasio

LOC107986766: lncRNA

LRP: *Low-density lipoprotein receptor* Receptor de lipoproteínas de baja densidad

LTF: Lactoferrina

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* Proteína quinasa activada por mitógeno

MMP: Metaloproteinasa de la matriz

MTHFR: metilentetrahidrofolato reductasa

MTRR: Metionina sintasa reductasa

MyD: *Myeloid differentiation primary response* Respuesta primaria de diferenciación mieloide

NF- $\kappa$ B: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas

NRAMP: *Natural resistance-associated macrophage protein* Proteína macrofágica asociada a la resistencia natural

OMS: Organización Mundial de la Salud

OPG: Osteoprotegerina

OR: *Odds ratio*

PADI: Programa de Asistencia Dental Infantil

PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern* Patrón molecular asociado a patógenos

PCR: Polymerase chain reaction Reacción en Cadena de la Polimerasa

PDGF: *Platelet-derived growth factor* Factor de crecimiento derivado plaquetario

PG: Polimorfismo genético

PI: Peri-implantitis

PMN: Polimorfonuclear

POM: Pérdida ósea marginal

POLR: *DNA-directed RNA polymerase* Polimerasa ARN DNA dirigida

PRK: *Proteina kinase* Proteína quinasa

PRR: *Pattern Recognition Receptor* Receptor de reconocimiento de patrones

PS: Profundidad de sondaje

PTH: Parathormona

RANKL: *Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand* Ligando de receptor activador para el factor nuclear  $\kappa$  B

RGS: *Regulator of G protein signaling* Regulador de la señalización de la proteína G

RX: Radiografía

RXP: *Relaxin/Insulin Like Peptide Receptor* Receptor del péptido relaxin/insulin-like

Sap: *Secreted aspartyl proteinase* Proteasa aspártica secretada

SSTR: *Somatostatin receptor* Receptor de somatostatina

SCN: *Sodium voltage-gated channel* Canal de sodio activado por voltaje

SD: *Standard deviation* Desviación estándar

SHMT: Serina hidroximetiltransferasa

SMAD: *Small mothers against decapentaplegic protein* Proteína madres contra decapentaplegic pequeña

SMC: *Structural Maintenance of Chromosome* Mantenimiento estructural de cromosomas

SNAP: *Synaptosomal-Associated Protein* Proteína asociada a sinaptosomas

SNP: *Single nucleotide polymorphism* Polimorfismo de un solo nucleótido

STAT: *Signal transducer and activator of transcription* Transductor de señal y activador de transcripción

SUFU: *Suppressor of fused homolog* Supresor de homólogo fusionado

TGF: *Transforming growth factor* Factor de crecimiento transformante

TNKSBP: *Tankyrase binding protein* Proteína de unión a tankyrasa

TRPV: *Transient receptor potential cation channel subfamily V* Subfamilia V del canal catiónico potencial receptor transitorio

TLR: *Toll-like receptor* Receptor tipo Toll

TSC: *Tuberous sclerosis* Esclerosis tuberosa

UFC: Unidad formadora de colonias

UPP: Uridina fosforilasa

TNF: *Tumour necrosis factor* Factor de necrosis tumoral

UPV/ EHU: Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea

VEGF: *Vascular epidermal growth factor* Factor de crecimiento endotelial vascular



## **9. APÉNDICES**

**9.1. Artículo 1.** Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Setien-Olarra A, Aguirre-Urizar JM, Marichalar-Mendia X. Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis. *Int J Implant Dent* 2022;8(1):1-9.

REVIEW

Open Access



# Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: systematic review and meta-analysis

Irene Lafuente-Ibáñez de Mendoza<sup>1</sup> , Amaia Setien-Olarra<sup>2</sup> , Ana María García-De la Fuente<sup>1</sup> , José Manuel Aguirre-Urizar<sup>1</sup> and Xabier Marichalar-Mendia<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Purpose:** To perform a systematic review and meta-analysis on the presence of inflammatory polymorphisms in patients with peri-implantitis (PI). PI is the main complication associated to dental implant therapy. Although its main risk factors are history of periodontitis, poor plaque control and lack of regular maintenance, genetic susceptibility could also be a determinant factor for its appearance. Single nucleotide polymorphisms (SNP) are small mutations of the DNA that alter the osseointegration of implants. Inflammatory proteins participate in both destruction of the extracellular matrix and reabsorption of the alveolar bone.

**Methods:** A bibliographical research was made in PubMed, Scopus and Web of Science (keywords: “single nucleotide polymorphism”, “polymorphism”, “periimplantitis”, “SNP” and “implant failure”).

**Results:** There is a statistically significant association of peri-implant bone loss with the homozygotic model of IL-1 $\beta$  (– 511) (OR: 2.255; IC: 1.040–4.889).

**Conclusions:** Associations between inflammatory polymorphisms and PI must be taken with caution due to the heterogeneous methodological design, sample size and diagnostic criteria of the studies. Thus, more well-designed studies are needed that analyze the relationship between these and more SNP and PI.

**Keywords:** Inflammation, Meta-analysis peri-implantitis, Single nucleotide polymorphism, Systematic review

## Introduction

The combination of high numbers for partial and total edentulism [1], together with an average life expectancy of over 70 years for the world population [2], shows that treatment with dental implants is a major health advance. However, the biological complications associated with this therapy, preferably peri-implantitis (PI), are frequent and must be prevented [3].

Peri-implantitis is an infectious and inflammatory multifactorial disease affecting more than 45% of patients

with dental implants, which is characterized by progressive loss of the alveolar bone [3]. History of periodontitis, poor plaque control and lack of regular maintenance are the main risk factors of this disorder [4]. Nevertheless, not all individuals with these features end up developing PI. Thus, genetic susceptibility has also been suggested as an important factor in the development of PI [5].

Genetic polymorphisms are individual variations at a given location in the DNA sequence, of which single nucleotide polymorphisms (SNP) are the most common [6]. The detection of SNP can be used to identify altered genes or proteins in a specific disease. Several genotypes of inflammatory proteins are strongly associated with chronic or aggressive periodontitis [7, 8]. In the case of

\*Correspondence: [xabier.marichalar@gmail.com](mailto:xabier.marichalar@gmail.com)

<sup>2</sup> Department of Nursery I, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



PI, different SNP involved in the inflammatory response have also been studied, mainly IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  [9].

IL-1 is a low molecular weight protein that promotes alveolar bone resorption, extracellular matrix destruction and osteoclastogenesis; thus, it plays an important role in bone physiopathology [9]. The most frequent and studied SNP are located at positions 3953 [*IL-1* (+3953)], 511 [*IL-1* (-511)] [10, 11] and 889 [*IL-1 $\alpha$*  (-889)]. SNP of other inflammatory molecules include *IL-10* (-1081) y *IL-6* (-174) and *TNF- $\alpha$*  (-308) [12–14]. The link between these SNP and peri-implantitis has been highly variable, probably due to differences in the diagnostic criteria. The mutation of these genes could trigger an abnormal inflammatory and resorptive response that decreases the osseointegration of dental implants. Discovering the existence of a specific genotypic profile of certain SNP in patients with peri-implantitis would help us assess the level of individual risk and establish appropriate preventive measures.

With this background, we planned to carry out a systematic review and meta-analysis, with the aim of understanding the relationship between the presence of proinflammatory polymorphisms and the development of peri-implantitis.

## Methods

### Information sources and search strategy

The design of this study matches the PRISMA criteria [15]. Systematic bibliographical research was performed in PubMed (US National Gallery of Medicine), Web of Science/Knowledge and Scopus, with the keywords “single nucleotide polymorphism”, SNP, “peri implantitis”, and “implant failure”: (“single nucleotide polymorphism” AND “peri implantitis”; “single nucleotide polymorphism” AND “implant failure”; SNP AND “peri implantitis”: SNP AND peri-implantitis; SNP AND “implant failure”). A manual search of the referenced studies, as well as of prominent journals of the field, was carried out aiming to include additional papers.

PECOS question was: patients with dental implants (population), with SNP of proinflammatory proteins (exposure), in contrast to patients with dental implants who do not have proinflammatory SNP (comparison), to study the effect of these SNP in the onset of peri-implantitis (outcome). Only longitudinal observational studies were included (type of study).

### Eligibility criteria

The articles selected for this work met the following inclusion criteria: (1) being published until October 2021; (2) being written in English or Spanish (guarantee of full comprehension of content); (3) human studies. Exclusion criteria were: (1) studies that did not analyze

proinflammatory polymorphisms and/or did not show the genotype frequencies; (2) studies on peri-implant disease that did not report the peri-implant bones loss; (3) previous meta-analysis or reviews, and (4) case reports, conferences or chapter of books. The information extracted from each study was: author and year of publication, type of study, number of patients (with and without PI) and genotype frequency of the polymorphisms.

### Selection process

Two independent reviewers made a duplicate bibliographical research (ILIM, ASO). Title and abstract of all registers were evaluated, and then, these were analyzed taking into account the inclusion and exclusion criteria. Any disagreement between the them was resolved by a third reviewer (XMM) to minimize risk of bias. Data about the included studies were gathered by two reviewers (ILIM, ASO) and double-checked by another three (XMM, AMGE, JMAU), to guarantee the integrity of the contents.

### Quality analysis

We used modified Newcastle-Ottawa Scale (NOS) [16] to assess the methodological quality of the included studies. This system analyzes the risk of bias of nonrandomized studies, taking into account three domains and eight items for case-control studies: selection, comparability and outcome. The total maximum score is 10; a study with a score from 8 to 10 has high quality; 4 to 7, high risk of bias; and 0 to 3, very high risk of bias.

### Statistical analysis

To analyze the heterogeneity of the studies,  $I^2$  test was applied. Fixed-effect model was used when  $I^2 < 50\%$ . To evaluate the correlation of PI with the susceptibility to different genotypes, the following genotypic models were carried out: heterozygous model (T/C vs T/T) and homozygous model (C/C vs T/T). For each model the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI 95%) were obtained. Statistical analysis was performed with the OpenMeta tool (Analyst).

## Results

### Results of the search

We obtained a total of 192 records in the initial research, out of which 103 were eliminated because they were duplicates. Additionally, three articles were included by manual search. After the initial screening, 47 articles were excluded: 43 for not investigating the presence of SNP in PI and 4 for not being available in full-text. Thus, 45 registers were analyzed for their suitability, but 15 were eliminated: 13 because they were previous meta-analyses or literature reviews and another 2 because

they were conference texts or book chapters. Also, we excluded 13 registers that did not analyze inflammatory polymorphisms and 5 that did not indicate the parameters used for the diagnosis of peri-implant disease. Finally, 12 studies were selected for the systematic review, whose data are shown in Table 1 [10–14, 17–23].

We were only able to use eight studies to perform the meta-analysis, due to lack of genotype data [10, 12, 13, 17–19, 21–23]. The summary of the selection process is shown in Fig. 1.

### Characteristics of included studies

In total, the included studies investigated 1015 patients, of 499 with peri-implantitis 516 without peri-implantitis. From these, 98 were from Asia (China and Japan) and the rest from other countries of Europe (Austria, Belgium, Germany, Italy, Turkey, Spain), America (Brazil) and Africa (Egypt). The authors used either radiographic alveolar bone loss (ABL) [10–14, 17, 19, 20, 22, 23] or peri-implant pocket depth (PPD) analysis [18, 21] to make the diagnosis (Table 1).

### IL-1 $\beta$ (+ 3953) and IL-1 $\beta$ (– 511)

Most of the studies included in this review analyze the possible relationship between the presence of SNP IL-1 $\beta$  (+ 3953) and the development of PI [10, 11, 17–21]. However, only two studies [10, 20] observed a statistically significant association between the composite genotype IL-1 $\beta$  (+ 3945) and IL-1 $\alpha$  (– 889), and patients with PI.

The link of SNP IL-1 $\beta$  (– 511) and peri-implantitis has been analyzed in four studies [10, 17, 19, 20], but only two conducted in Japan [17, 19] recognized a direct relation to peri-implant bone loss.

### IL-10 (– 1081) y IL-6 (– 174)

The IL-10 SNP (– 1081) was assessed in two studies [13, 23], and it was only associated to PI in German smoker patients or with a history of periodontitis [23]. On the contrary, IL-6 SNP (– 174) was only associated with PI in Serbian individuals [14, 21, 23].

### TNF- $\alpha$ (– 308)

TNF- $\alpha$  genotype (– 308) was only linked to peri-implant disease in Serbian patients [22, 23], and not in Brazilians [12, 13].

### Meta-analysis

Our study revealed that there are no statistically significant link between the presence of IL-1 $\beta$  (+ 3953) nor TNF- $\alpha$  (– 308) polymorphisms and peri-implantitis (Figs. 2 and 3). However, we did observe a risk association between the presence of the C/C genotype of the SNP IL-1 $\beta$  (– 511) and peri-implantitis (T/C vs T/T:  $I^2=0\%$ ,  $p=0.921$ ; OR: 0.902; IC 95% 0.510–1.595 and C/C vs T/T:  $I^2=0\%$ ,  $p=0.555$ ; OR: 2.255; IC 95%: 1.040–4.889) (Fig. 4).

### Quality of studies

After applying modified NOS assessment, 16.67% of the studies revealed 8 stars and 83.3% of them 6 (Table 2). Overall risk of bias was low.

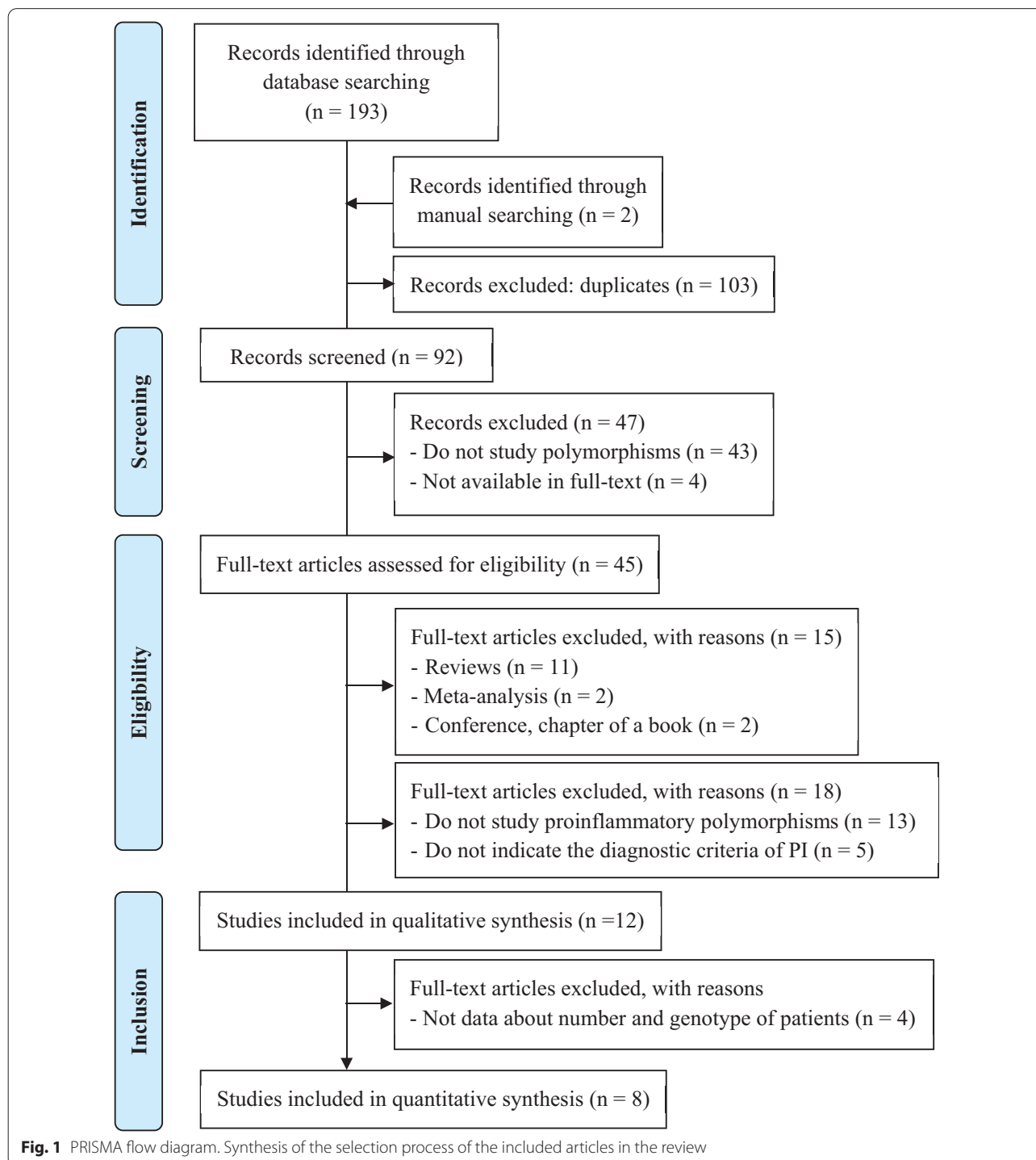
### Discussion

The first cases of peri-implantitis were described as “inflammatory reactions with loss of supporting bone in the tissues surrounding a functioning implant” [24]. PI is physiopathologically different to periodontitis and has

**Table 1** Main data of the included studies

Authors, year	Patients			Diagnostic criteria for diagnosis of peri-implantitis
	Ethnicity	Case	Control	
Shimpuku et al. 2003	Japan	17	22	ABL > 0.5 mm
Laine et al. 2006	Belgium	71	44	ABL (3 threads), BOP, pus
Cury et al. 2007	Brazil	17	19	ABL (3 threads), BOP, pus
Lachmann et al. 2007	Germany	11	18	PPD > 4 mm
Lin et al. 2007	Japan	29	30	ABL > 0,5 mm
Hamdy et al. 2007	Egipt	25	25	PPD > 4 mm, ABL, BOP
Gurol et al. 2011	Turkey	32	46	ABL > 3 mm, PPD > 5 mm, BOP, pus
Melo et al. 2012	Italy	16	31	PPD > 4 mm, BOP, pus
Ladeira-Casado et al. 2013	Brazil	31	40	ABL > 3 mm, pus
García-Delaney et al. 2015	Spain	27	27	ABL > 2 mm, PD > 4 mm, BOP, pus
Rakic et al. 2015	Germany	189	180	ABL (> 2 threads), PPD > 5 mm, BOP
Petkovic-Curcin et al. 2017	Serbia	34	34	ABL (> 2 threads), PPD > 4 mm, BOP

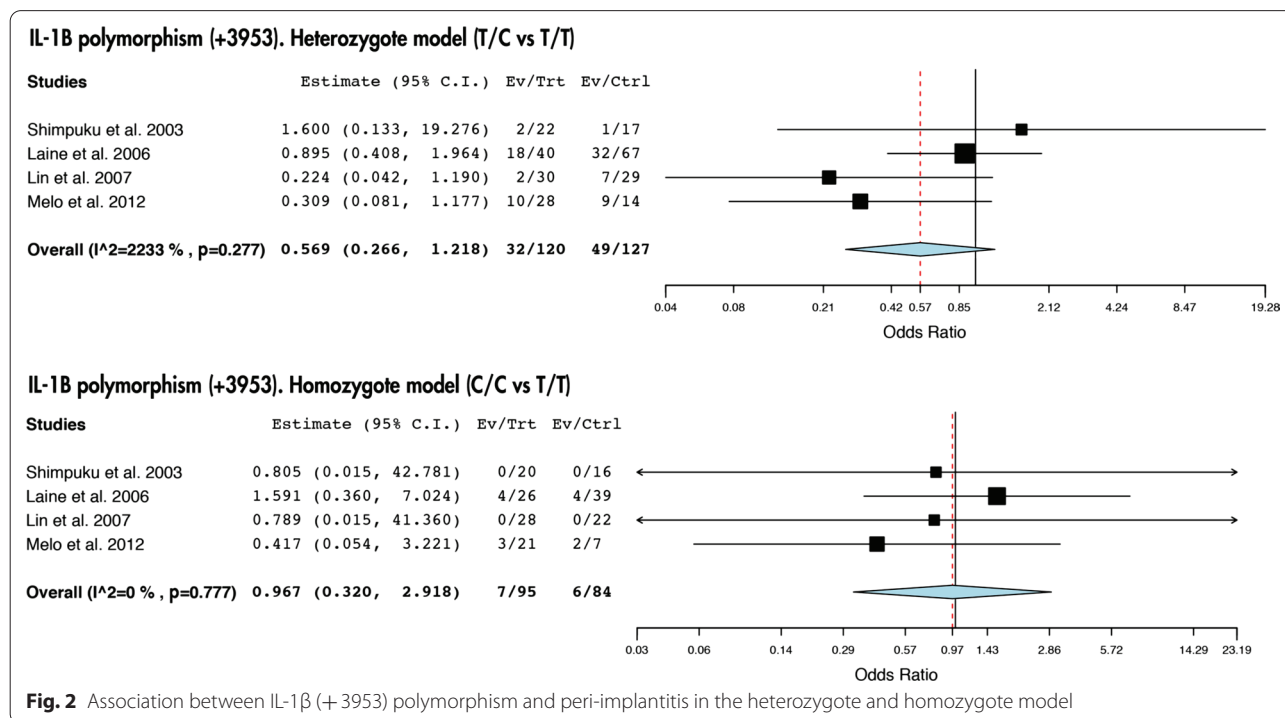
Case: patients with peri-implantitis. Control: patients without peri-implantitis. ABL: alveolar bone loss; BOP: bleeding on probing; PPD: peri-implant pocket depth



recently been considered as an inflammatory disorder (“Peri-implant Conditions and Diseases”) [25, 26].

Inflammation is a physiological response that participates in many acute and chronic diseases in humans [27]. The term interleukin-1 was firstly used in the International Lymphokine Workshop in Ermatingen

in 1979 [28], to define “a macrophagic product that stimulates T and B cells, with non-immunological properties”. Because there is strong evidence of the role of IL-1 $\beta$  in the physiopathology of periodontitis [8], recent research has tried to discover its link to peri-implantitis.

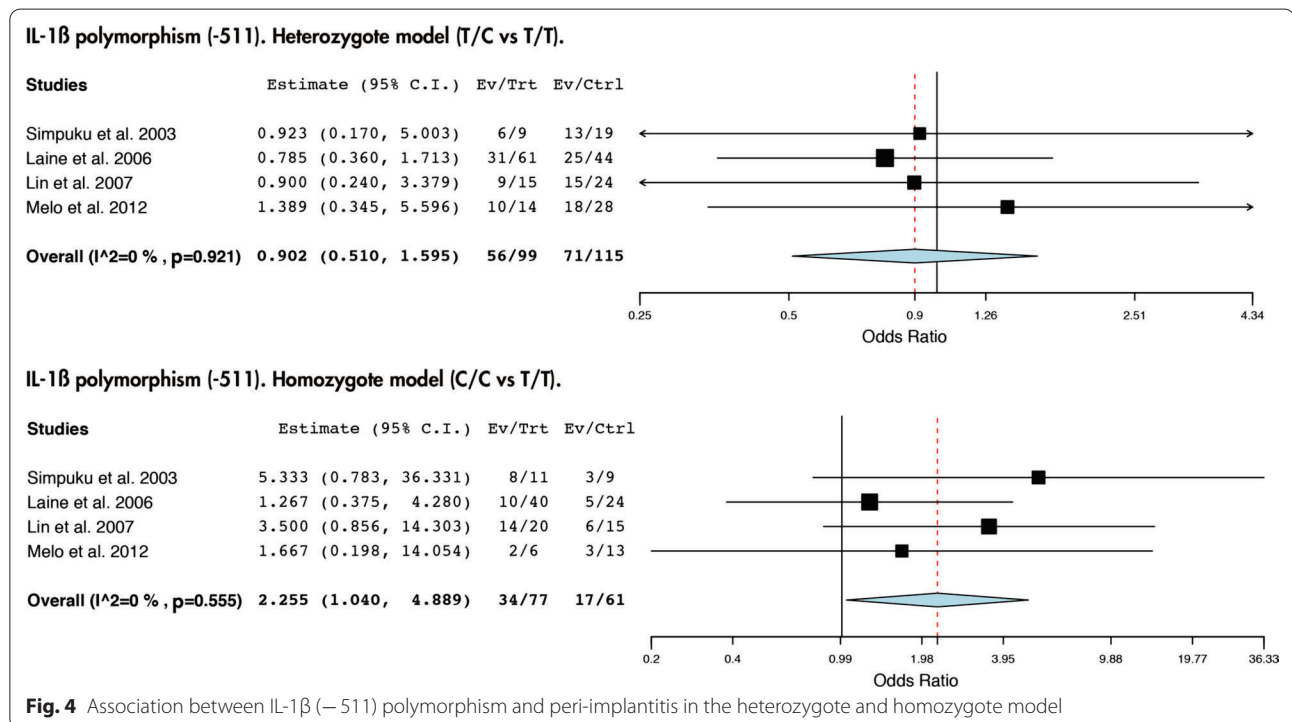
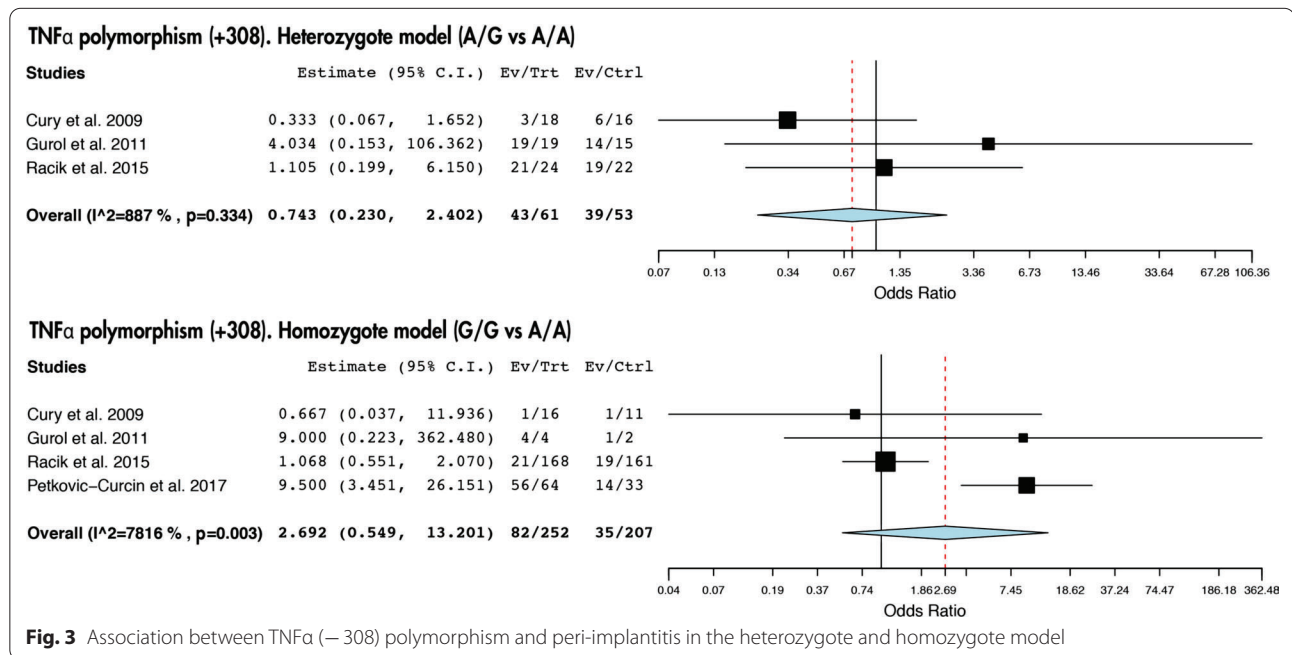


After conducting this review, we found that only two authors demonstrated a significant association between the composite genotype of IL-1β (+3945) and IL-1α (−889) and the presence of peri-implantitis [10, 18]. This genotype has already been associated to patients with chronic periodontitis, but not with aggressive periodontitis [8]. Thus, we believe that there may be only a specific group of patients with peri-implantitis who present this genotypic profile. Myeloid differentiation factor-88 (MyD88) is responsible for the activation of proinflammatory cytokines IL1β and IL-1α, inducing at the same time an intracellular cascade system that secretes both proteins to the extracellular matrix [29]. Unlike IL-1β, IL-1α has a silent nuclear expression under normal homeostasis that changes during the inflammatory response [29]. This may explain why IL-1α polymorphism [IL-1α (−899)] alone is not independently associated with the development of PI.

During the eligibility analysis, several studies were excluded because they did not indicate the diagnostic criteria of PI. From these, Feloutzis et al. [30] and Grucica et al. [31] found a significant association between SNP IL-1β (+3953) and peri-implant bone loss in heavy smokers (>20 cigarettes/day). However, they did not indicate whether the patients had peri-implantitis. Furthermore, our analysis did not find a significant association between IL-1β (+3953) polymorphism, tobacco use and PI [15, 16, 25, 27].

In contrast, two study groups from Japan reported a strong link between IL-1β (−511) and PI [17, 19], which remained significant at the final meta-analysis (Fig. 4). This positive result could respond to the fact that some authors used ABL >0.5 mm as diagnostic criteria for PI (Table 1). Although the first sign of peri-implantitis can be the presence of a bone loss (0.5 mm) [32], diagnosis of PI is based on: (1) presence of bleeding and/or suppuration on gentle probing, (2) probing depths of ≥6 mm, or bigger than previous examinations, and (3) bone levels ≥3 mm apical of the most coronal portion of the intraosseous part of the implant, or greater than initial bone remodeling [26]. Therefore, the PI cases of several studies [17, 19] could currently be reclassified as peri-implant health and more studies are needed to further clarify this relationship. Furthermore, the fact that the other studies that also analyzed this SNP did not observe such link, with more precise diagnostic criteria of PI (Table 1), make us believe that the C/C genotype of IL-1β (−511) would truly be associated to alveolar bone loss and not actual peri-implantitis [10, 21].

The diagnostic criteria of peri-implantitis have been in constant change throughout the years, and it is not possible to ensure that all the patients were correctly classified as either healthy or sick. Since these variations are very important in risk assessment studies, the application of the latest classification of periodontal diseases



may reduce this bias, allowing the homogeneity of future investigations [33].

IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine that reduces the synthesis of proinflammatory chemokines (IL-1, TNF- $\alpha$ ) and extracellular matrix proteins

(gelatinase, collagenase), while enhancing osteoblast differentiation and inhibiting osteoclast formation [34]. Mutations in its gene could affect bone homeostasis. However, the IL-10 SNP (–1081) has only been associated with patients who smoke or have a history of



**Table 2** Quality assessment of the included studies: NOS tool

Authors, year	Type of study	New Castle-Ottawa Scale (NOS)		
		Selection	Comparability	Exposure
Shimpuku et al. 2003	Case-control	★★★	★	★★
Laine et al. 2006	Case-control	★★★	★★	★★
Cury et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Lachmann et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Lin et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Hamdy et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Guroi et al. 2011	Case-control	★★★	★	★★
Melo et al. 2012	Case-control	★★★	★	★★
Ladeira-Casado et al. 2013	Case-control	★★★	★	★★
García-Delaney et al. 2015	Case-control	★★★	★	★★
Rakic et al. 2015	Case-control	★★★	★★	★★
Petkovic-Curcin et al. 2017	Case-control	★★★	★	★★

periodontitis [23]. In contrast, IL-6 has a dual role in bone remodeling. Under normal conditions, it suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation of osteoclast progenitors, and under inflammatory conditions it induces RANKL expression in osteoblasts and facilitates the proliferation of osteoclast progenitors [35]. Thus, alterations on IL-6 gene need to be evaluated together with those of other inflammatory markers. This may explain why the IL-6 SNP (−174) does not affect all individuals equally [23].

A proinflammatory cytokine that also plays an essential role in bone remodeling and homeostasis is tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), suppressing osteoblastic proliferation and activating osteoclastogenesis from its early stage, when marrow-derived macrophages are still osteoclast precursor cells [36]. In this work only few authors have recognized a relation between the TNF- $\alpha$  (−308) SNP and peri-implantitis [22, 23]. Since the meta-analysis confirmed this association as significant, further studies with more patients will be needed.

This systematic review has some limitations. First, the evidence level of the included studies was low (class III) [37]. Therefore, the reliability of our conclusions might be low. And second, the sample sizes in the investigated studies were small. High-evidence SNP studies normally need very more patients and, thus, the power analysis might be as low as 5%. Taking all this into account, it is necessary to plan more well-designed studies with larger samples, in order to further analyze the involvement of these genetic polymorphisms and more inflammatory molecules involved in peri-implant processes.

## Conclusions

In summary, after performing this systematic review and meta-analysis we conclude that, currently, there is no evidence that patients carrying the IL-1 $\beta$  (+3945), IL-10 (−1081), IL-6 (−174) or TNF- $\alpha$  (−308) SNPs have a higher risk of developing peri-implantitis. However, individuals with the C/C genotype of the SNP IL-1 $\beta$  (−511) and those with composite genotype IL1 $\beta$  (+3945) and IL-1 $\alpha$  (−889) may have a higher risk for peri-implantitis. Also, patients who smoke more than 20 cigarettes a day and have IL-1 $\beta$  (+3953) polymorphism would have a higher risk of peri-implant bone loss.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Authors' contributions

Each author is expected to have made substantial contributions to the conception OR design of the work; OR the acquisition, analysis, OR interpretation of data; OR the creation of new software used in the work; OR have drafted the work or substantively revised it. ILIM: conceptualization and design of the work; acquisition and interpretation of data; drafted the work. ASO: design of the work; acquisition and analysis of data; drafted the work. AMGCL: interpretation of data; substantively revised the work. JMAU: conception of the work; interpretation of data; substantively revised the work. XMM: conception of the work; analysis of data; substantively revised the work. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its additional information files].

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Stomatology II, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Spain. <sup>2</sup>Department of Nursery I, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain.

Received: 16 July 2021 Accepted: 11 January 2022

Published online: 21 January 2022

## References

- Müller F, Naharro M, Carlsson GE. What are the prevalence and incidence of tooth loss in the adult and elderly population in Europe? *Clin Oral Implants Res.* 2017;18(3):2–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01459.x>.
- World Health Organization. Global health observatory (GHO) data. Life expectancy. Geneva: World Health Organization; 2016. [https://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/life\\_tables/situation\\_trends/en/](https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/situation_trends/en/).
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017;62:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>.
- Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: a systematic review. *J Periodontol Res.* 2018;53(5):657–81. <https://doi.org/10.1111/jre.12562>.
- Lee S, Kim JY, Hwang J, Kim S, Lee JH, Han DH. Investigation of pathogenic genes in peri-implantitis from implant clustering failure patients: a whole-exome sequencing pilot study. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e99360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099360>.
- Smith A, Krishnan L, Stein LD, International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Genome Res.* 2005;15(11):1592–3. <https://doi.org/10.1101/gr.4413105>.
- Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol* 2000. 2012;58(1):37–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00415.x>.
- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol* 2000. 2007;43(1):102–32. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00164.x>.
- Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8–27. <https://doi.org/10.1111/immr.12621>.
- Laine ML, Leonhardt Å, Roos-Jansåker AM, Peña AS, Van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Renvert S. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(4):380–5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01249.x>.
- García-Delaney C, Sánchez-Garcés MÁ, Figueiredo R, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Clinical significance of interleukin-1 genotype in smoking patients as a predictor of peri-implantitis: a case-control study. *Med Oral Pat Oral Cir Bucal.* 2015;20(6):e737–43. <https://doi.org/10.4317/medoral.20655>.
- Cury PR, Joly JC, Freitas N, Sendyk WR, Nunes FD, de Araújo NS. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism on peri-implant bone loss following prosthetic reconstruction. *Implant Dent.* 2007;16(1):80–8.
- Guroi C, Kazazoglu E, Dabakoglu B, Korachi M. A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2011;26(5):955–60.
- Ladeira-Casado P, Villas-Boas R, de Mello W, Leite Duarte ME, Mauro GJ. Peri-implant disease and chronic periodontitis: is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a Brazilian population? *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2013;28(1):35–43.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med.* 2009;151(4):264–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
- Wells GA, Tugwell P, O'Connell D, Welch V, Peterson J, Shea B, Losos M. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. 2015. [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp).
- Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):423–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.110823.x>.
- Lachmann S, Kimmerle-Müller E, Axmann D, Scheideler L, Weber H, Haas R. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A–889 and IL-1B+ 3954 genotype: a cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(2):212–23. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01322.x>.
- Lin YH, Huang P, Lu X, Guan DH, Man Y, Wei N, Gong P. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2340–4. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.06.673>.
- Hamdy AAEMM, Ebrahim MAEM. The effect of interleukin-1 allele 2 genotype (IL-1a– 889 and IL-1b+ 3954) on the individual's susceptibility to peri-implantitis: case-control study. *J Oral Implants.* 2011;37(3):325–34. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-09-00117.1>.
- Melo RF, Lopes BM, Shibli JA, Marcantonio Junior E, Marcantonio RAC, Galli GMT. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 expression and gene polymorphisms in subjects with peri-implant disease. *Clin Implants Dent Relat Res.* 2012;14(6):905–14. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2010.00325.x>.
- Rakic M, Petkovic-Curcin A, Struillou X, Matic S, Stamatovic N, Vojvodic D. CD14 and TNF $\alpha$  single nucleotide polymorphisms are candidates for genetic biomarkers of peri-implantitis. *Clin Oral Invest.* 2015;19(4):791–801.
- Petkovic-Curcin A, Zeljic K, Cikota-Aleksic B, Dakovic D, Tatic Z, Magic Z. Association of cytokine gene polymorphism with peri-implantitis risk. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2017;32(5):e241–8.
- Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T, editors. Proceedings of the 1st European Workshop on periodontology. 1st ed. London: Quintessence Publishing; 1994. p. 365–9.
- Lang NP, Berglundh T. Working Group 4 of Seventh European Workshop on P. Peri Implant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011;38(11):178–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x>.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):S246–66. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12954>.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(3):S140–6. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x>.
- Aarden LA, Brunner TK, Cerottini C, Dayer M, de Weck AL, Dinarello CA, et al. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. *J Immunol.* 1979;123(6):2928–9.
- Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol.* 2011;187(9):4835–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048>.
- Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Bürgin W, Brägger U, Buser D, Duff GW, Kornman KS. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for periimplant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(1):10–7. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.140102.x>.
- Gruica B, Wang HY, Lang NP, Buser D. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Implant Res.* 2004;15(4):393–400. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01026.x>.
- Derks J, Schaller D, Hakansson J, Wennstrom JL, Tomasi C, Berglundh T. Peri-implantitis-onset and pattern of progression. *J Clin Periodontol.* 2016;43(4):383–8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12535>.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—introduction and key changes from the 1999

classification. *J Periodontol.* 2018;45(20):S1–8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>.

34. Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Res Int.* 2014;16:284836. <https://doi.org/10.1155/2014/284836>.
35. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11535–40.
36. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis. *Front Immunol.* 2014;5:48. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>.
37. Burns PB, Rohrich RJ, Chung KC. The levels of evidence and their role in evidence-based medicine. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128:305–10.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:**

- ▶ Convenient online submission
- ▶ Rigorous peer review
- ▶ Open access: articles freely available online
- ▶ High visibility within the field
- ▶ Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ▶ [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

---



**9.2. Artículo 2.** Lafuente-Ibanez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar J. A systematic review on the implication of Candida in peri-implantitis. Int J Implant Dent 2021;7(1):1-9.

REVIEW

Open Access

# A systematic review on the implication of *Candida* in peri-implantitis



Irene Lafuente-Ibáñez de Mendoza<sup>1</sup>, Amaia Cayero-Garay<sup>1</sup>, Guillermo Quindós-Andrés<sup>2</sup> and José Manuel Aguirre-Urizar<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Candida* is a heterogeneous fungal genus. Subgingival sulcus is a refuge for *Candida*, which has already been related to the pathogenic inflammation of periodontitis. This work aims to review the presence of *Candida* in the sulcular fluid surrounding dental implants and discuss its potential role in peri-implantitis.

**Results:** A bibliographical research was performed in PubMed, Scopus and Web of Science databases, with the keywords *candida*, peri-implantitis, periimplantitis, “dental implant” and implant. Newcastle-Ottawa Scale was used to assess the methodological quality of the included studies. At the end, nine observational studies were included, which analysed 400 dental implants with PI and 337 without peri-implantitis. Presence of *Candida* was assessed by traditional microbiological culture in blood agar or/and CHROMagar, though identification was also detected by quantitative real-time PCR, random amplified polymorphic DNA or ATB ID 32C. Dentate individuals and implants with peri-implantitis (range, 3–76.7%) had a bigger presence of *Candida*. *C. albicans* was the most isolated species, followed by *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida dubliniensis*.

**Conclusion:** *Candida* is part of the microbiological profile of the peri-implant sulcular fluid. More studies are needed to compare the link between *Candida* and other microorganisms and to discover the true role of these fungi in peri-implantitis.

**Keywords:** *Candida*, Peri-implantitis, Systematic review

## Background

Oral rehabilitation with dental implants is a predictable and safe therapeutic procedure to treat tooth loss, in both partially and completely edentulous patients. Throughout the years, more advances have been made in the design, surface and chirurgical protocols of the implant systems, whose success can reach up to 95% of cases [1, 2].

Mechanical and biological complications are the main cause of dental implant failure. Peri-implantitis (PI) is a multifactorial infectious disease characterized by inflammation in the peri-implant mucosa and a progressive loss of supporting bone [3]. Although inflammatory

response is more pronounced in the tissues surrounding the implants than in those surrounding the teeth [4], the microbiological environment associated to PI is similar to the observed in conventional periodontal disease, which includes anaerobic Gram-negative bacteria, such as *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [5]. Other microorganisms, for example fungi, like *Candida*, could also participate in the onset and development of PI, since *Candida* colonization and biofilm formation is relatively common on other metallic surfaces, like hip and knee prostheses [6, 7]. However, there is a direct association between surface roughness and hydrophobicity with biofilm development as surface topography influenced microbial adhesion. For instance, titanium is one of the biomaterials most resistant to microbial

\* Correspondence: [Josemanuel.aguirre@ehu.es](mailto:Josemanuel.aguirre@ehu.es)

<sup>1</sup>Department of Stomatology II, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Vizcaya, Spain

Full list of author information is available at the end of the article

colonization and to the development of *C. albicans* and bacterial biofilms [8].

*Candida* is a commensal of the oral cavity that can be isolated from many healthy individuals but can trigger mucosa infections (candidiasis) associated to different predisposing factors, like immunodeficiency [9]. Subgingival sulcus can also play as a refuge for pathogenic fungi [10]. In addition, different species of *Candida* have already been associated with the maintenance of periodontal inflammation in periodontitis [11, 12]. Nevertheless, the mechanisms by which *Candida* may enhance bone resorption, especially in the jaws, are unclear.

*Candida albicans* is the species more frequently isolated in PI, developing thick biofilms over the peri-implant surface [10]. Given its ability to adhere to the implant area in intimate contact with the bone, it has been hypothesized that *Candida* could also contribute to the progression of PI, but this link has yet to be elucidated.

The objective of this work is to make a systematic review of the literature, aiming to recognize the presence of different species of *Candida* in the peri-implant niche and to discuss its role in the pathogenesis and progression of peri-implantitis.

## Methods

### Research strategy

The methodological design of this study matches the PRISMA criteria and guidelines [13]. In this systematic review, we address the question “what is the role of *Candida* in the development of peri-implantitis?”.

Two independent co-authors (ILIM, ACG) performed a systematic bibliographical research in PubMed (US National Gallery of Medicine), Scopus and Web of Science/Knowledge. The search strategy consisted in different combinations of the MeSH keywords: *Candida*, peri-implantitis, periimplantitis, “dental implant” and implant (*candida* AND peri-implantitis; *candida* AND periimplantitis; *candida* AND dental implant; *candida* AND implant).

### Inclusion and exclusion criteria

Inclusion criteria were studies published in English or Spanish until December 2020 in patients with dental implants and diagnosis of PI and/or analysing samples from the sulcular fluid surrounding dental implants. Among exclusion criteria were case reports, reviews, position papers, and author opinions. Moreover, those studies not available in full format and experimental studies were also excluded.

### Selection of the studies and data collection

The study selection and data extraction were also performed by two reviewers (JMAU and ILIM). A third one

(JMAU) participated in the decision-making in case of doubt about the inclusion of the studies. Also, if essential data for the review was missing or unclear, the corresponding author clarified the problem.

The titles and abstracts of the retrieved references were screened for relevance and after this, the full texts of all articles potentially eligible were analysed against the inclusion/exclusion criteria. In order to collect the information of the different studies retrieved, a standard document was utilized for data regarding authors, year of publication, study design, diagnostic criteria, clinical specimens, implant systems used, and microbiological methods. In addition, quantitative data on the isolation of *Candida* and other microorganisms were collected for both peri-implantitis and healthy implants.

For categorical variables, we performed a descriptive statistical analysis to obtain frequencies and percentages, as well as to determine the average and standard deviation for quantitative variables.

### Risk of bias

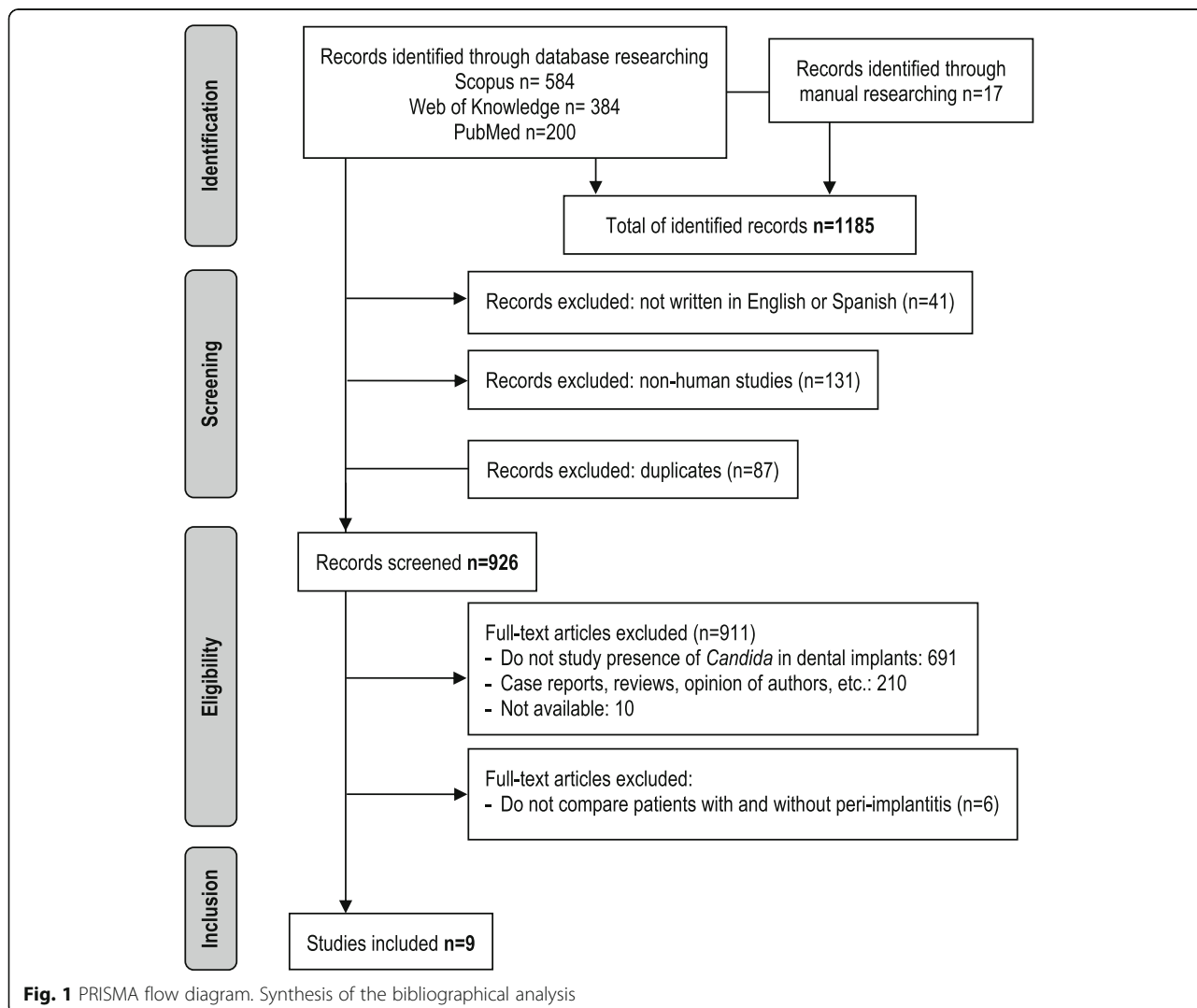
A modified Newcastle-Ottawa Scale (NOS) was used to assess the methodological quality of the included studies [14]. This system analyses the risk of bias of nonrandomized studies, taking into account three domains and eight items for cohort studies: selection, comparability and outcome. The total maximum score is 9; a study with a score from 7 to 9 has high quality; 4 to 6, high risk of bias; and 0 to 3, very high risk of bias.

## Results

### Bibliographical search and retrieval

The selection process of search and retrieval of literature is showed in Fig. 1. Initially, 1185 records were retrieved from databases, from which 41 were excluded due to not being published in English or Spanish, 131 because they were not made in humans and 87 for being duplicates. Thus, 926 articles were screened, but 691 were eliminated because they did not study the presence of *Candida* in dental implants, another 210 for being case reports, reviews or author opinions and other 10 for not being available in full-text.

After the detailed analysis, 15 articles studying the presence of *Candida* in patients with dental implants were included. However, during the extraction data process, we saw that only nine of them compared patients with and without PI, which accounted for the 0.78% of the initial number (Table 1) [10, 15–22]. So, the remaining six manuscripts were discarded since they studied patients with dental implants but without diagnosis of the peri-implant status [2, 23–27].



**Table 1** Clinical data of the included studies

Authors and year	Country	Assessment of <i>Candida</i>	Patients			Mean age (years)	Dental implants		
			Total	PI	Healthy		Total	PI	Healthy
Rosenberg et al. 1991 [15]	USA	-	75	11	64	-	83	-	-
Leonhardt et al. 1999 [16]	Sweden	Blood agar	88	37	51	63	-	-	-
Listgarten et al. 1999 [17]	USA	Blood agar	41	41	0	59	44	44	0
Albertini et al. 2015 [18]	Spain	CHROMagar	33	33	0	67.1	48	48	0
Canullo et al. 2015 [19]	Italy	qPCR	534	53	481	62,25	235	231	1276
Schwarz et al. 2015 [20]	Germany	qPCR	29	19	10	-	29	19	10
Bertone et al. 2016 [21]	Argentine	CHROMagar	40	40	0	56	89	49	40
Alrabiah et al. 2019 [10]	Saudi Arabia	CHROMagar	84	43	41	53,65	84	43	41
Alsahhaf et al. 2019 [22]	Saudi Arabia	CHROMagar	126	84	42	55,77	126	84	42

PI peri-implantitis

### Clinical and microbiological characteristics of the included studies

The microbiological analysis was performed, in all the studies, collecting samples from the sulcular fluid with sterile paper points for different periods. Presence of *Candida* was assessed by traditional microbiological culture in blood agar [16, 17] or/and CHROMagar [10, 18, 22, 23]. Identification of clinical isolates of different *Candida* species was also detected by either quantitative real-time PCR [19, 21], random amplified polymorphic DNA [22] or ATB ID 32 [18]. In all cases, the patients had not taken antibiotics, at least 2 months before taking the samples.

These studies analysed 626 patients, 361 with PI (57.7%) and 265 without PI (42.3%), whose mean age varied between 53 and 67 years. Data about gender was available in 5 studies [10, 18, 19, 21, 23], from which 20.3% were women (38 with PI and 33 without PI) and 79.7% (162 with PI and 117 without PI) men. Curiously, two articles from Saudi Arabia did not include female patients [10, 23]. In total, 737 patients wearing dental implants were investigated, 400 (54.3%) with peri-implantitis and 337 (45.7%) without PI (Table 1).

Only one study did not find *Candida* in the sulcular fluid [17]. The rest of the studies recognized a bigger presence of the fungi in the implants with PI (range, 3–76.7%), in contrast to healthy ones (range, 9–50%) [15, 16, 18, 19, 21–23]. Dentate patients also had more *Candida* in their implants than edentulous ones [16, 19]. Fungal colonization was observed only in dental implants with PI in three studies [15, 16, 18].

*C. albicans* was the most isolated species, followed by *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* and *Candida lusitaniae* (Table 2). Rosenberg et al. [15] did not indicate the species of *Candida*. Most of the authors reported presence of *C. albicans*, as well as *C. boidinii*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*

and *C. lusitaniae* [10, 21–23]. None of the authors stated if these were pure or polifungal *Candida* biofilms [10, 21–23]. *C. albicans* alone was observed in three studies [16–18].

### Risk of bias in individual studies

After applying modified NOS assessment, 22.2% of the studies revealed 9 stars, 44.5% of them 8 and 33.3% of them 7 (Table 3). Overall, risk of bias was low.

### Clinical and microbiological characteristics of the excluded studies

The six articles excluded in this review analysed the presence of *Candida* in the sulcular fluid surrounding 362 dental implants [2, 23–27]. In most reports, *C. albicans* was isolated [2, 23, 25, 26]; however, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *Candida kefyr* and *Candida norvegensis* were also observed [20, 24, 26] (Table 4). The presence of *Candida* was variable, affecting between 10 and 71% of the implants. The study of Peñarrocha et al. [24] was the only one in which no *Candida* was observed in the implants investigated. This absence of *Candida* colonization might be related to the small sample size (20 patients) and to the fact that they look for the presence of *C. albicans* and no other species of *Candida*.

Gomes et al. [26] described that the quantity of *Candida* was bigger at 8 months was higher than that observed at 4 months after implant placement. Mencia et al. [2] only observed the presence of *C. albicans* in implants with cemented implant-abutment connections but not in those with screwed implant-abutment connections. In addition, Kilic et al. [23] found more *Candida* colonization in patients with bar-retained overdentures (25%) than in those with locator-retained overdentures (19%) (Table 3).

**Table 2** Microbiological findings of the included studies. Species of *Candida*

Authors and year	<i>Candida</i> presence (%)			Species of <i>Candida</i>
	Total	PI	Healthy	
Rosenberg et al. 1991 [15]	32	32	0	-
Leonhardt et al. 1999 [16]	27	27	0	<i>C. albicans</i>
Albertini et al. 2015 [18]	3	3	-	<i>C. albicans</i>
Canullo et al. 2015 [19]	13.5	16.9	15.9%	<i>C. albicans</i>
Schwarz et al. 2015 [20]	12.9	15.8	10	<i>C. albicans</i> , <i>C. boidinii</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Bertone et al. 2016 [21]	51.5	53	50	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i>
Alrabiah et al. 2019 [10]	44.5	76.7	12.2	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>
Alsahhaf et al. 2019 [22]	43	76.2	9.8	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>

PI peri-implantitis

**Table 3** Quality assessment of the included studies. NOS tool

Authors, year	Type of study	Newcastle-Ottawa Scale (NOS)		
		Selection	Comparison	Exposure/outcome
Rosenberg et al. 1991 [15]	Case-control	★★	★★	★★★
Leonhardt et al. 1999 [16]	Case-control	★★	★★	★★★
Listgarten et al. 1999 [17]	Cohort	★★★	★★	★★★
Albertini et al. 2015 [18]	Cohort	★★★	★★	★★★
Canullo et al. 2015 [19]	Case-control	★★	★★	★★★
Schwarz et al. 2015 [20]	Case-control	★★★	★★	★★★
Bertone et al. 2016 [21]	Cohort	★★★	★★	★★★
Alrabiah et al. 2019 [10]	Case-control	★★★★	★★	★★★
Alsahhaf et al. 2019 [22]	Case-control	★★★★	★★	★★★

## Discussion

*Candida* is a heterogeneous fungal genus composed by more than 150 species. Although some species of *Candida* coexist as human commensals, they can cause superficial and systemic infections under certain circumstances [28]. Most candidiasis are caused by *C. albicans*, but in the recent years other non-*C. albicans* species have manifested a pathogenic capacity. Among the most frequently isolated from clinical specimens are *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* [29].

The pathogenicity of *Candida* responds to a set of virulence factors, including dimorphism, secretion of hydrolytic enzymes (proteases, lipases and haemolysins) and adhesion and biofilm formation on the mucous epithelium and on medical devices [30, 31]. Formation of biofilms is a complex sequential process that depends on the invasive agent and the structure on which it is hosted [32]. Yeast colonization of biotic and abiotic surfaces is the first step in the development of biofilms, followed by cell division and microcolonies generation that contribute to the maturation of a biofilm characterized by the presence of hyphae and yeasts (sessile cells) embedded in an extracellular matrix and, finally, the detachment of some of these cells [33]. The release of planktonic cells into the environment allows them to colonize new surfaces and to develop new foci of candidiasis.

Because the diagnostic criteria of the peri-implant diseases have been in constant change, the diagnosis of peri-implantitis in the included studies have differed from one to another, due to being published over a long period of time, from 1991 to 2020. Yet most of the reviewed studies collected data about bleeding and/or suppuration on probing, probing depth and radiographic bone loss. Moreover, implant mobility and presence of keratinized mucosa was evaluated in three studies [15, 16, 20, 21]. For all these reasons, although it cannot be guaranteed that all the implants studied in this work have been correctly categorized as healthy or diseased, the margin of error could not be very wide [5, 34, 35]. In regards to the risk factor of PI, none of the studies excluded patients with history of periodontitis and two discarded smokers [10, 22]. Still, only one of the nine selected articles did not state whether they found *Candida* or not [17].

According to the included studies of this review, implants with peri-implantitis (range, 3–76.7%) had a higher presence of *Candida* than those without peri-implantitis (range, 9–50%). However, we do not know why prevalence of *Candida* was significantly bigger in the studies with individuals from Saudi Arabia [10, 22]. Since fungal assessment and sample size were similar to other studies [16, 18], we believe these particular results may be related to special geographical and sociocultural

**Table 4** Clinical data and microbiological findings of the excluded studies\*

Authors and year (country)	Patients (implants)	Isolation of <i>Candida</i> from clinical specimens	
		%	Species
Kilic et al. 2014 (Turkey) [23]	37 (37)	71	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. norvegensis</i>
Peñarrocha et al. 2015 (Spain) [24]	20 (43)	0	-
Canullo et al. 2015 (Italy) [25]	40 (80)	15	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Gomes et al. 2017 (Brazil) [26]	14 (60)	-	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Mencio et al. 2017 (Italy) [2]	20 (50)	10	<i>C. albicans</i>
Ju et al. 2019 (South Korea) [27]	92 (92)	13	-

\*These articles were excluded due to the absence of any peri-implant diagnostic criteria



factors, such as diet, and the fact that these authors excluded female patients and smokers [10, 22].

Moreover, the fact that 10–71% of implants, regardless of peri-implantitis, showed the presence of this fungus demonstrates that colonization of *Candida* in the peri-implant environment is independent of the disease. Also, because a slightly higher number of patients with bar-retained overdentures had *Candida*, in contrast to locator-retained overdentures, time and hygiene of implants might also be important factors of fungal colonization.

Schwarz et al. [20] were the sole authors to state a direct relationship between *Candida* and other microorganisms. Thereby, from three implants with PI, *C. boidinii* was isolated alongside *Mycoplasma salivarum*, *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra* and *Tannerella forsythia* in one of them, and in the other two, *C. albicans* was also found with *V. parvula*, *T. forsythia*, *M. salivarum*, *P. gingivalis* and *P. micra*. On the other hand, *C. dubliniensis* was accompanied by *M. salivarum*, *V. parvula*, *Staphylococcus aureus*, *P. micra* and *T. forsythia* in one healthy implant. The latter species of *Candida*, *C. dubliniensis* has been isolated from patients suffering from different oral pathologies, resembling *C. albicans* in many virulence factors including hypha formation and hydrolytic enzyme production [36, 37]. In this context, *Candida* colonization could be linked to the presence of other periodontopathogens, like *T. forsythia*, *P. micra* or *P. gingivalis*. Although the exact role of *Candida* in the beginning of the peri-implant disease is unknown, we believe that this fungus could play an important function in the latter stages of PI, when the bacterial micro-environment is already established, as demonstrated in experimental studies [38].

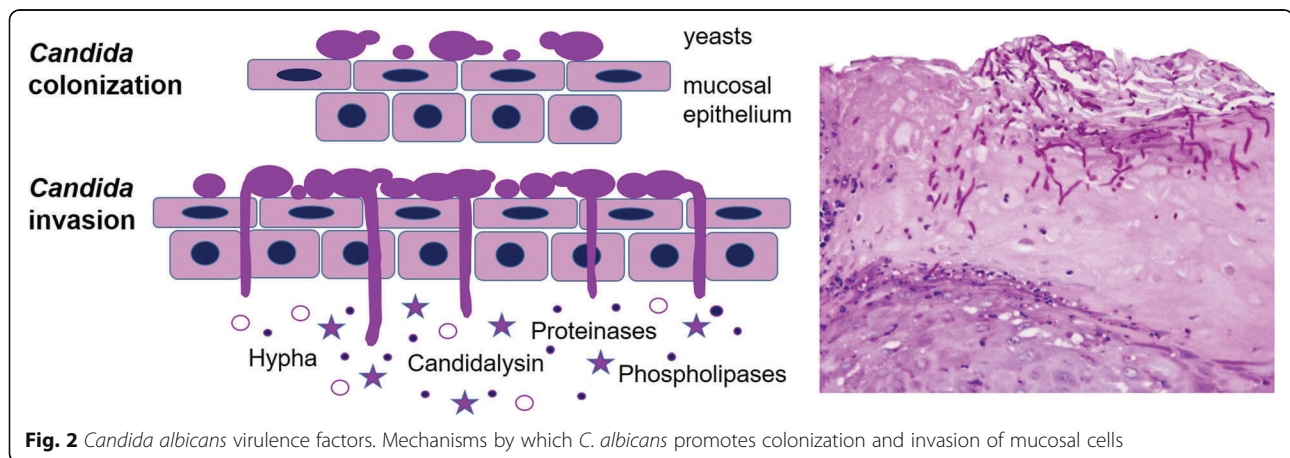
Knowledge of the involvement of *Candida* infection in disorders of bone remodelling is limited, but it has been described in *Candida* arthritis and osteomyelitis [39, 40], nosological entities described very rarely in the jaws [41, 42]. *Candida* arthritis and osteomyelitis develop by haematogenous invasion, mainly in patients with immunodeficiency, being *C. albicans* is usually the most frequently isolated, although *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* has also been isolated [40]. As in the latter processes, *Candida* would act as a modifying agent in chronic inflammation around dental implants that activates the bone resorption response.

Anaerobiosis, as occurs in peri-implant pockets, can promote the virulence of *C. albicans*, increasing the activity of secreted aspartyl proteinases (Sap) [43]. These Sap proteins are associated to *Candida* adherence, tissue damage and modulation of immune response, maintaining inflammatory stimuli that attract other periodontopathogens [44, 45]. This role of Saps is important because the ability to form thick biofilms is easier for *C.*

*albicans*, both under aerobic and anaerobic conditions, whereas for the rest of the species of *Candida*, growth is much greater only under aerobic conditions [46]. *C. albicans* hyphae secrete candidalysin, a 31-amino-acid peptide toxin that damages the epithelial cells and has an immunomodulatory capacity by binding to epidermal growth factor receptor (ErbB1 or Her1) [47]. Yeast and hyphal morphologies are present during asymptomatic *C. albicans* colonization of human mucosal surfaces. However, hypha formation can lead to candidalysin secretion, tissue damage and immune modulation (Fig. 2). Furthermore, *C. albicans* 95-kDa metallopeptidase, localized in cell wall, owns the capacity to destroy different elements of the peri-implant soft and hard tissues like type I collagen (connective tissue, alveolar bone and cement), type IV collagen (basement membrane of the mucosa), fibronectin (periodontal ligament) and laminin (basement membrane of the mucosa and cement) [48–50].

Interestingly, one study [22] pointed that patients with dental implants in which *Candida* was isolated, also had a higher presence of these fungi at the buccal, lingual and palatal mucosa. Although this study did not differentiate between implants with and without PI, it evidences the existence of an oral reservoir for *Candida* that facilitates the entry of this fungus into the peri-implant sulcus.

This systematic review has limitations. First, only nine studies analysed the presence of *Candida* in patients with peri-implantitis including very heterogeneous samples (range, 20–126 studied specimens). Second, few studies reported the number of *Candida* colony-forming units (CFU), which is a fundamental data for the mycological analysis [9, 51]. Alrabiah et al. [10] showed significant differences in the quantity of *Candida* between specimens from patients suffering PI (3147.54 CFU/mL) and from patients without PI ( $496.68 \pm 100.2$  CFU/mL). These findings are similar to those found by Alsahhaf et al. [22] (2316.26 vs 177.6 CFU/ml). Third, it was impossible to analyse the differences of *Candida* in patients with PI, regarding the type, composition, design and surface of the implants, because only Leonhardt et al. [16], said that their implants were Nobel Biocare AB (Gothenburg, Sweden). We are convinced of the importance of studying the implant characteristics, since they can be strongly related to colonization and infection, according to how they allow *Candida* adherence. There is a strong association between implant properties and microbial adhesion, titanium being one of the most resistant to *Candida* colonization and biofilm development [8]. Moreover, there is a considerable heterogeneity of the selected studies regarding the microbial methods and study design then results obtained from different microbiological methods did not allow for a direct comparison.



**Fig. 2** *Candida albicans* virulence factors. Mechanisms by which *C. albicans* promotes colonization and invasion of mucosal cells

## Conclusions

In summary, *Candida* is a common inhabitant of the peri-implant sulcular sulcus microbial environment, both in healthy implants and in those from people suffering from PI. However, *Candida* presence is more common in peri-implantitis. This presence and the *Candida* concentrations in the peri-implant tissue can be related to the lapse of time dental implants have been in the oral cavity. In addition, the quantity of *Candida* in the sulcular fluid surrounding the implants might rely on the presence of other periodontopathogens, such as *V. parvula*, *T. forsythia*, *M. salivarium*, *P. gingivalis* or *P. micra*. Although, *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are the most common species in peri-implantitis, others have also been identified, such as *C. dubliniensis*, *C. boidinii*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* and *C. lusitaniae*, but in a very low frequency. Better-designed studies are needed, with larger patient samples, to unravel whether there is a relevant role for *Candida* in the etiopathogenesis of peri-implantitis and dental implant failure.

## Acknowledgements

Not applicable

## Authors' contributions

ILIM made substantial contributions to the conception and design of the work and acquisition, analysis, and interpretation of data. ACCG contributed to the conception of the work and of data. GQA contributed to interpretation of data and substantively revised the draft. JMAU made substantial contributions to the conception of the work, interpretation of data, and substantively revised the draft. The authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors. The authors have no conflict of interest related to the study.

## Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

Irene Lafuente-Ibáñez de Mendoza, Amaia Cayero-Garay, Guillermo Quindós-Andrés and José Manuel Aguirre-Urizar declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Stomatology II, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Vizcaya, Spain. <sup>2</sup>Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Vizcaya, Spain.

Received: 9 February 2021 Accepted: 30 March 2021

Published online: 17 June 2021

## References

- Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Brägger U, Hämmerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI® Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(3):329–39. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.000.00934.x>.
- Mencio F, De Angelis F, Papi P, Rosella D, Pompa G, Di Carlo S. A randomized clinical trial about presence of pathogenic microflora and risk of peri-implantitis: comparison of two different types of implant-abutment connections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(7):1443–51.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S246–66. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12954>.
- Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol.* 2011;38:188–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01672.x>.
- Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2014;16(6):783–93. <https://doi.org/10.1111/cid.12052>.
- Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010;6(6):2307–13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.003>.
- Cobo F, Rodríguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martínez L, Navarro-Marí JM. *Candida* prosthetic joint infection. A review of treatment methods. *J Bone Joint Inf.* 2017;2(2):114–21. <https://doi.org/10.7150/jbji.17699>.
- De-la-Pinta I, Cobos M, Ibarretxe J, Montoya E, Eraso E, Guraya T, et al. Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development.



- J Mater Sci Mater Med. 2019;30(7):77. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6281-3>.
9. Aguirre-Urizar JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19(1):17–21.
  10. Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojaly SA, Abduljabbar T, Javed F. Presence of *Candida* species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clin Implants Dent Relat Res.* 2019;21(4):781–5.
  11. Urzúa B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Sabouraudia.* 2008;46(8):783–93. <https://doi.org/10.1080/13693780802060899>.
  12. De la Torre J, Quindós G, Marcos-Arias C, Marichalar-Mendia X, Gainza ML, Eraso E, et al. Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(3):134–9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.03.005>.
  13. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Int Med.* 2009;151(4):264–9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>.
  14. Wells GA, Tugwell P, O'Connell D, Welch V, Peterson J, Shea B et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses (2015). Retrieved from [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp)
  15. Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(3):135–44. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1991.020306.x>.
  16. Leonhardt Å, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(5):339–45. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1999.100501.x>.
  17. Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol.* 1999;70(4):431–7. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.4.431>.
  18. Albertini M, López-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos, et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(8):937–41. <https://doi.org/10.1111/clr.12387>.
  19. Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Covani U, Rossetti PHO. Microbiologic and clinical findings of implants in healthy condition and with peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(4):834–42. <https://doi.org/10.11607/jomi.3947>.
  20. Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Soldini C, Mazzocco F, Penarrocha M, Covani U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):426–34. <https://doi.org/10.1111/clr.12383>.
  21. Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeiffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent.* 2015;1(1):9. <https://doi.org/10.1186/s40729-015-0010-6>.
  22. Bertone AM, Rosa AC, Nastri N, Santillán HD, Ariza Y, Iovanitti CA, et al. Genetic-relatedness of peri-implants and buccal *Candida albicans* isolates determined by RAPD-PCR. *Acta Odontol Lat.* 2016;29(3):197–205.
  23. Alsahhaf A, Al-Aali KA, Alshagroud RS, Alshiddi IF, Alrahlah A, Abduljabbar T, et al. Comparison of yeasts species in the subgingival oral biofilm of individuals with type 2 diabetes and peri-implantitis and individuals with peri-implantitis without diabetes. *J Periodontol.* 2019;90(12):1383–9. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0091>.
  24. Kilic K, Koc AN, Tekinsen FF, Yildiz P, Kilic D, Zararsiz G, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in bar-and locator-retained overdentures. *J Implantol.* 2014;40(5):549–56. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-12-00048>.
  25. Peñarrocha-Oltra D, Rossetti PH, Covani U, Galluccio F, Canullo L. Microbial leakage at the implant-abutment connection due to implant insertion maneuvers: cross-sectional study 5 years postloading in healthy patients. *J Oral Implantol.* 2015;41(6):e292–6. <https://doi.org/10.1563/aa-id-joi-D-14-00235>.
  26. Gomes JA, Sartori IA, Able FB, de Oliveira Silva TS, do Nascimento C. Microbiological and clinical outcomes of fixed complete-arch mandibular prostheses supported by immediate implants in individuals with history of chronic periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(6):734–41. <https://doi.org/10.1111/clr.12871>.
  27. Ju HM, Ahn YW, Jeong SH, Jeon HM, Kim KH, Song BS, et al. Characteristics of patients who perceive dental treatment as a cause of oral mucosal lesions. *J Oral Sci.* 2019;61(3):468–74. <https://doi.org/10.2334/josnusd.18-0292>.
  28. Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trend Microbiol.* 2017;25(1):62–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.004>.
  29. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int Microbiol.* 2018; 21(3):107–17. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0014-1>.
  30. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 2002;3(12):918–30. <https://doi.org/10.1038/nrg948>.
  31. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119–28. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
  32. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 2012;148(1-2):126–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048>.
  33. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2012;9(2):109–18.
  34. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol.* 2012;39(5):425–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x>.
  35. Carcuac O, Berglundh T. Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions. *J Dent Res.* 2014;93(11):1083–8. <https://doi.org/10.1177/0022034514551754>.
  36. Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol.* 2002;42(3):207–27. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200206\)42:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200206)42:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-C).
  37. Sahand IH, Maza JL, Eraso E, Montejo M, Moragues MD, Aguirre JM, et al. Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity. *J Med Microbiol.* 2009;58:1437–42.
  38. Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury AA, da Silva WJ, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling.* 2016;32(2):123–34. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1125472>.
  39. Slenker AK, Keith SW, Horn DL. Two hundred and eleven cases of *Candida* osteomyelitis: 17 case reports and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):89–93. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.004>.
  40. Gamaletsou MN, Ramaert B, Bueno MA, Sipsas NV, Moriyama B, Kontoyiannis D, et al. *Candida* arthritis: analysis of 112 pediatric and adult cases. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3(1):ofv207. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv207>.
  41. Attie MD, Anderson IA, Portnof J. Mandibular osteomyelitis associated with *Candida albicans* in marijuana and heroin abusers. *Ann Maxillofac Surg.* 2018;8(2):355–7. [https://doi.org/10.4103/ams.ams\\_83\\_18](https://doi.org/10.4103/ams.ams_83_18).
  42. Kaushal D, Sharma A, Kesarwani A, Kalita JM. Chronic *Candida* osteomyelitis of hard palate and nose: a diagnostic quandary. *Med Mycol Case Rep.* 2019; 24:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mmc.2019.01.003>.
  43. Rosa EAR, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, da Silva WJ, Yau JYY, et al. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2008;57(10):1277–81. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001107-0>.
  44. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(3):400–28. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>.
  45. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2008; 62(1):10–24.
  46. Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):761–7. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.01.009>.
  47. Naglik JR, Gaffen SL, Hube B. Candidalysin: Discovery and function in *Candida albicans* infections. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:100–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.002>.
  48. Rodier MH, El Moudni B, Kauffmann-Lacroix C, Danialt G, Jacquemin JL. A *Candida albicans* metalloproteinase degrades constitutive proteins of

extracellular matrix. *FEMS Microbiol Let.* 1999;177(2):205–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13733.x>.

49. Embery G, Waddington RJ, Hall RC, Last KS. Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol 2000.* 2000;24(1):193–214.
50. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontol Res.* 2013;48(4):428–32. <https://doi.org/10.1111/jre.12022>.
51. Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K, Kurashina K, Kurita H, Uchida M, et al. Candida concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs. *BMC Oral Health.* 2015;15(1):150. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0138-z>.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

---

9.3. SNP de proteínas no específicas incluidos en el array: Análisis comparativo por grupos.

Gen-SNP	Genotipo	Grupo de estudio: n (%)		p
		GCO	GCA	
LTF rs1034383	AA	15,4 (12)	18,9 (14)	0,648
	AG	41 (32)	44,6 (33)	
	GG	43,6 (34)	36,5 (27)	
LTF rs17078864	CC	84,8 (67)	73 (54)	0,185
	CT	13,9 (11)	25,7 (19)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	
LTF rs12629300	AA	77,2 (61)	68,9 (51)	0,504
	AT	21,5 (17)	29,7 (22)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	
LTF rs17141154	AA	1,3 (1)	2,7 (2)	0,103
	AG	15,2 (12)	28,4 (21)	
	GG	83,5 (66)	68,9 (51)	
LTF rs6441990	CC	59,2 (45)	51,4 (38)	0,601
	CG	32,9 (25)	40,5 (30)	
	GG	7,9 (6)	8,1 (6)	
LTF rs6441995	CC	58,2 (46)	48,6 (36)	0,472
	CT	34,2 (27)	40,5 (30)	
	TT	7,6 (6)	10,8 (8)	
LTF rs7629657	CC	82,3 (65)	86,5 (64)	0,751
	CT	16,5 (13)	12,2 (9)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	
LTF rs9862186	AA	72,7 (56)	58,1 (43)	0,157
	AG	24,7 (19)	36,5 (27)	
	GG	2,6 (2)	5,4 (4)	
ADR $\alpha$ 1 $\alpha$ rs1383914	AA	32,4 (24)	31,9 (23)	0,958
	AG	50 (37)	48,6 (35)	
	GG	17,6 (13)	19,4 (14)	
ADR $\alpha$ 1 $\alpha$ rs1048101	CC	22,8 (18)	18,9 (14)	0,814
	CT	49,4 (39)	50 (37)	
	TT	27,8 (22)	31,1 (23)	
ADR $\beta$ 2 rs1042713	AA	12,7 (10)	12,2 (9)	0,987
	AG	49,4 (39)	48,6 (36)	
	GG	38 (30)	39,2 (29)	
CHST11 rs835487	AA	38 (30)	41,1 (30)	0,513
	AG	48,1 (38)	39,7 (29)	
	GG	13,9 (11)	19,2 (14)	
SNAP25 rs3746544	AA	30,8 (24)	44,6 (33)	0,173
	AC	50 (39)	43,2 (32)	
	CC	19,2 (15)	12,2 (9)	
DRD2 rs6277	CC	16,5 (13)	16,2 (12)	0,939
	CT	40,5 (32)	43,2 (32)	
	TT	43 (34)	40,5 (30)	
DROSHA rs7719666	CC	38 (30)	39,2 (29)	0,876
	CT	45,6 (36)	41,9 (31)	
	TT	16,5 (13)	18,9 (14)	
DROSHA rs3805500	CC	14,1 (11)	12,2 (9)	0,497
	CT	50 (39)	59,5 (44)	
	TT	35,9 (28)	28,4 (21)	
SMC1B rs3747238	CC	20,3 (16)	14,9 (11)	0,587
	CT	50,6 (40)	50 (37)	
	TT	29,1 (23)	35,1 (26)	
TRPV2 rs395357	CC	24,1 (19)	25,7 (19)	0,964
	CT	50,6 (40)	48,6 (36)	
	TT	25,3 (20)	25,7 (19)	
HTR2A rs6311	CC	25,3 (20)	39,2 (29)	0,132
	CT	50,6 (40)	36,5 (27)	
	TT	24,1 (19)	24,3 (18)	
POLR1C rs699937	CC	50,6 (40)	35,1 (26)	0,125
	CT	41,8 (33)	51,4 (38)	
	TT	7,6 (6)	13,5 (10)	

SCN9α rs12620053	AA	30,4 (24)	35,1 (26)	0,776
	AC	53,2 (42)	51,4 (38)	
	CC	16,5 (13)	13,5 (10)	
SCN9α rs7607967	AA	20,3 (16)	20,3 (15)	0,55
	AG	36,7 (29)	44,6 (33)	
	GG	43 (34)	35,1 (26)	
SCN9α rs13017637	CC	31,6 (25)	28,4 (21)	0,874
	CT	49,4 (39)	50 (37)	
	TT	19 (15)	21,6 (16)	
SCN9α rs4453709	AA	35,4 (28)	32,4 (24)	0,766
	AT	45,6 (36)	51,4 (38)	
	TT	19 (15)	16,2 (12)	
GDF5 rs143383	CC	16,5 (13)	14,9 (11)	0,911
	CT	50,6 (40)	54,1 (40)	
	TT	32,9 (26)	31,1 (23)	
LOC107986766 rs2097903	AA	26,6 (21)	39,2 (29)	0,233
	AT	53,2 (42)	41,9 (31)	
	TT	20,3 (16)	18,9 (14)	
SSTR2 rs7210080	CC	8,9 (7)	9,5 (7)	0,577
	CT	32,9 (26)	40,5 (30)	
	TT	58,2 (46)	50 (37)	
CHST11 rs835487	AA	38 (30)	41,1 (30)	0,513
	AG	48,1 (38)	39,7 (29)	
	GG	13,9 (11)	19,2 (14)	
MTRR rs1801394	AA	31,6 (25)	23 (17)	0,351
	AG	44,3 (35)	55,4 (41)	
	GG	24,1 (19)	21,6 (16)	
ESR1 rs2234693	CC	26,6 (21)	28,4 (21)	0,377
	CT	48,1 (38)	55,4 (41)	
	TT	25,3 (20)	16,2 (12)	
ESR1 rs1643821	CC	23,1 (18)	26,8 (19)	0,871
	CT	51,3 (40)	49,3 (35)	
	TT	25,6 (20)	23,9 (17)	
GFRα1 rs3781545	AA	3,8 (3)	2,7 (2)	0,86
	AG	27,8 (22)	31,1 (23)	
	GG	68,4 (54)	66,2 (49)	
TGFβ1 rs1800469	CC	34 (46,6)	36 (49,3)	0,53
	CT	30 (41,1)	32 (43,8)	
	TT	9 (12,3)	5 (6,9)	
KCNS1 rs734784	AA	25,3 (20)	23 (17)	0,137
	AG	48,1 (38)	62,2 (46)	
	GG	26,6 (21)	14,9 (11)	
ENPP1 rs858339	AA	12,7 (10)	8,1 (6)	0,635
	AT	40,5 (32)	44,6 (33)	
	TT	46,8 (37)	47,3 (35)	
BRAF rs10487888	AA	22,8 (18)	32,4 (24)	0,303
	AG	51,9 (41)	50 (37)	
	GG	25,3 (20)	17,6 (13)	
SMAD3 rs12901499	AA	19 (15)	28,4 (21)	0,209
	AG	46,8 (37)	48,6 (36)	
	GG	34,2 (27)	23 (17)	
RXP2 rs1531554	CC	29,5 (23)	35,1 (26)	0,757
	CT	52,6 (41)	48,6 (36)	
	TT	17,9 (14)	16,2 (12)	
MTHFR rs2236225	CC	31,6 (25)	32,4 (24)	0,789
	CT	51,9 (41)	47,3 (35)	
	TT	16,5 (13)	20,3 (15)	
MTHFR rs1801131	AA	46,2 (36)	54,1 (40)	0,575
	AC	46,2 (36)	37,8 (28)	
	CC	7,7 (6)	8,1 (6)	
UPP2 rs7565931	CC	1,3 (1)	2,7 (2)	0,561
	CG	29,1 (23)	35,1 (26)	
	GG	69,6 (55)	62,2 (46)	
PRKCa	CC	38 (30)	39,2 (29)	0,763

rs887797	CT	50,6 (40)	45,9 (34)	
	TT	11,4 (9)	14,9 (11)	
JAK2 rs2274471	CC	9 (7)	10,8 (8)	0,812
	CT	38,5 (30)	33,8 (25)	
	TT	52,6 (41)	55,4 (41)	
RGS7 rs6689169	AA	77,2 (61)	82,2 (60)	0,52
	AG	21,5 (17)	17,8 (13)	
	GG	1,3 (1)	0 (0)	
RGS13 rs3795617	AA	22,8 (18)	20,3 (15)	0,812
	AG	48,1 (38)	45,9 (34)	
	GG	29,1 (23)	33,8 (25)	
SUFU rs11594179	CC	53,2 (42)	51,4 (38)	0,513
	CT	35,4 (28)	41,9 (31)	
	TT	11,4 (9)	6,8 (5)	
COMT rs165599	AA	49,4 (39)	45,9 (34)	0,792
	AG	40,5 (32)	40,5 (30)	
	GG	10,1 (8)	13,5 (10)	
COMT rs4680	AA	27,8 (22)	28,4 (21)	0,796
	AG	41,8 (33)	45,9 (34)	
	GG	30,4 (24)	25,7 (19)	
COL1 $\alpha$ 1 rs1800012	GG	53,8 (42)	60,3 (44)	0,552
	GT	38,5 (30)	30,1 (22)	
	TT	7,7 (6)	9,6 (7)	
SHMT1 rs1979277	AA	13,9 (11)	5,4 (4)	0,125
	AG	40,5 (32)	36,5 (27)	
	GG	45,6 (36)	58,1 (43)	
LRP1 rs11172113	CC	12,7 (10)	13,5 (10)	0,517
	CT	40,5 (32)	48,6 (36)	
	TT	46,8 (37)	37,8 (28)	
TNKS1BP rs11602501	AA	22,4 (17)	31,5 (23)	0,369
	AC	43,4 (33)	42,5 (31)	
	CC	34,2 (26)	26 (19)	
TSC1 rs3827665	CC	87,3 (69)	78,4 (58)	0,318
	CT	11,4 (9)	20,3 (15)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	

**9.4. SNP de proteínas de la respuesta inflamatoria y el remodelado óseo: Análisis por factores de riesgo: Antecedente de periodontitis.**

Gen-SNP	Genotipo	GCA		p	GCA		p
		Antecedente periodontitis: n (%)			Antecedente periodontitis: n (%)		
		No	Si		No	Si	
GBP1 rs7911	CC	7 (18,42)	4 (21,05)	0,61	7 (13,73)	5 (17,86)	0,88
	CT	15 (39,47)	5 (26,32)		30 (58,82)	16 (57,14)	
	TT	16 (42,11)	10 (52,63)		14 (27,45)	7 (25)	
IL1 $\beta$ rs16944	AA	5 (13,16)	2 (10,53)	0,96	4 (7,84)	2 (7,14)	0,12
	AG	17 (44,74)	9 (47,37)		28 (54,9)	9 (32,14)	
	GG	16 (42,11)	8 (42,11)		19 (37,25)	17 (60,71)	
IL6 rs1800795	CC	6 (15,79)	2 (11,11)	0,52	3 (6)	3 (10,71)	0,76
	CG	17 (44,74)	11 (61,11)		28 (56)	15 (53,57)	
	GG	15 (39,47)	5 (27,78)		19 (38)	10 (35,71)	
IL10 rs1800896	AA	12 (31,58)	8 (42,11)	0,46	20 (39,22)	13 (46,43)	0,40
	AG	20 (52,63)	10 (52,63)		24 (47,06)	9 (32,14)	
	GG	6 (15,79)	1 (5,26)		7 (13,73)	6 (21,43)	
BMP4 rs17563	CC	12 (31,58)	4 (21,05)	0,20	10 (19,61)	6 (21,43)	0,97
	CT	20 (52,63)	8 (42,11)		27 (52,94)	14 (50)	
	TT	6 (15,79)	7 (36,84)		14 (27,45)	8 (28,57)	
BRINP3 rs1935881	AA	20 (52,63)	11 (57,89)	0,83	18 (35,29)	8 (28,57)	0,83
	AG	15 (39,48)	6 (31,58)		28 (54,9)	17 (60,71)	
	GG	3 (7,89)	2 (10,53)		5 (9,8)	3 (10,71)	
CD14 rs2569190	AA	10 (26,32)	4 (21,05)	0,16	10 (19,61)	6 (21,43)	0,97
	AG	21 (55,26)	7 (36,84)		29 (56,86)	16 (57,14)	
	GG	7 (18,42)	8 (42,11)		12 (23,53)	6 (21,43)	
FGF3 rs1893047	AA	9 (23,68)	5 (26,32)	0,82	9 (17,65)	6 (21,43)	0,73
	AG	18 (47,37)	10 (52,63)		25 (49,02)	15 (53,57)	
	GG	11 (28,95)	4 (21,05)		17 (33,33)	7 (25)	
FGF10 rs900379	CC	9 (23,70)	2 (10,50)	0,47	4 (7,84)	4 (14,29)	0,67
	CT	14 (36,80)	9 (47,40)		22 (43,14)	11 (39,29)	
	TT	15 (39,50)	8 (42,10)		25 (49,02)	13 (46,43)	
LTF rs1126477	AA	5 (13,16)	0 (0)	0,23	3 (5,88)	0 (0)	0,10
	AG	12 (31,58)	8 (42,11)		12 (23,53)	11 (40,74)	
	GG	21 (55,26)	11 (57,89)		36 (70,59)	16 (59,26)	
OPG rs2073617	CC	5 (13,16)	4 (21,05)	0,17	9 (17,65)	9 (32,14)	0,31
	CT	22 (57,89)	6 (31,58)		24 (47,06)	12 (42,86)	
	TT	11 (28,95)	9 (47,37)		18 (35,29)	7 (25)	
RANKL rs9533156	CC	2 (5,27)	5 (26,32)	0,06	8 (15,69)	7 (25)	0,10
	CT	22 (57,89)	7 (36,84)		22 (43,14)	16 (57,14)	
	TT	14 (36,84)	7 (36,84)		21 (41,18)	5 (17,86)	

9.5. Análisis de correlación entre las diferentes variables citológicas.

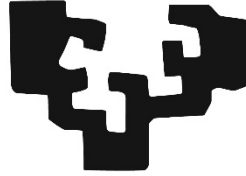
Grupo de estudio		Detritus	$\rho$	Microbiota simple	$\rho$	Células inflamatorias: PMNs	$\rho$	Células inflamatorias: Linfocitos	$\rho$
GCO	Detritus	1							
	Microbiota simple	0,29	<b>&lt;0,01</b>	1					
	Células inflamatorias: PMNs	0,43	<b>&lt;0,01</b>	0,32	<b>&lt;0,01</b>	1			
	Células inflamatorias: Linfocitos	0,39	<b>&lt;0,01</b>	0,44	<b>&lt;0,01</b>	0,63	<b>&lt;0,01</b>	1	
	Hematíes	0,05	0,66	0,12	0,29	0,05	0,70	0,02	0,86
	Células colonizadas	0,35	<b>&lt;0,01</b>	0,49	<b>&lt;0,01</b>	0,40	<b>&lt;0,01</b>	0,49	<b>&lt;0,01</b>
GCA sin PI	Detritus	1							
	Microbiota simple	0,32	<b>0,01</b>	1					
	Células inflamatorias: PMNs	0,25	0,06	0,50	<b>&lt;0,01</b>	1			
	Células inflamatorias: Linfocitos	0,17	0,20	0,27	<b>0,04</b>	0,38	<b>&lt;0,01</b>	1	
	Hematíes	0,08	0,55	0,14	0,30	0,36	<b>&lt;0,01</b>	0,02	0,90
	Células colonizadas	0,33	<b>&lt;0,01</b>	0,38	<b>&lt;0,01</b>	0,34	<b>&lt;0,01</b>	0,27	<b>0,04</b>
GCA con PI	Detritus	1							
	Microbiota simple	0,43	<b>&lt;0,01</b>	1					
	Células inflamatorias: PMNs	0,32	<b>&lt;0,01</b>	0,16	0,17	1			
	Células inflamatorias: Linfocitos	0,31	<b>&lt;0,01</b>	0,22	<b>0,05</b>	0,47	<b>&lt;0,01</b>	1	
	Hematíes	0,04	0,75	0,10	0,39	0,35	<b>&lt;0,01</b>	0,01	0,90
	Células colonizadas	0,69	<b>&lt;0,01</b>	0,50	<b>&lt;0,01</b>	0,40	<b>&lt;0,01</b>	0,41	<b>&lt;0,01</b>







eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

## DOKTOREGO TESIA

### **Analisi genetikoa, zitologikoa eta mikologikoa Euskal Autonomia Erkidegoko Periimplantitisa diagnostikatutako pazienteetan**

Irene Lafuente Ibáñez de Mendoza

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Doktorego Programa

Estomatologia II Saila

Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea

2022

Zuzendariak:

José Manuel Aguirre Urizar Irakaslea

Xabier Marichalar Mendia Irakaslea



## AURKIBIDEA

1. Sarrera .....	7-13
1.1. Hipotesia .....	11-12
1.2. Helburuak .....	13
2. Aurrekariak .....	15-40
2.1. Gaixotasun periinplantarioa .....	15-22
2.2. Sentikortasun genetikoa gaixotasun periinplantarioan .....	23-29
2.3. Zitologia esfoliatiboa gaixotasun periinplantarioan .....	30-33
2.4. <i>Candida spp.</i> gaixotasun periinplantarioan .....	34-40
3. Material eta Metodoak .....	42-66
3.1. Pazienteak .....	46-45
3.1.1. Sartzeko eta baztertzeko irizpideak .....	42-44
3.1.2. Protokolo kliniko-patologikoa .....	45
3.2. Laginak jasotzea .....	46-64
3.2.1. Analisi genetikorako lagina .....	46-54
3.2.1.1. Lagin genetikoa hartzea .....	46
3.2.1.2. Lagin genetikoaren analisisa .....	47-54
3.2.2. Analisi zitologikorako lagina .....	55-58
3.2.2.1. Lagin zitologikoa hartzea .....	55-56
3.2.2.2. Lagin zitologikoaren analisisa .....	56-57
3.2.2.3. Elementu zitologikoak identifikatzeko protokoloa ... ..	57-58
3.2.3. Analisi mikologikorako lagina .....	59-64
3.2.3.1. Lagin mikologikoa hartzea .....	59
3.2.3.2. Lagin mikologikoaren analisisa .....	60-64
3.3. Analisi estatistikoa .....	65-66

4. Emaitzak .....	68-103
4.1. Pazienteak .....	68-74
4.1.1. Datu orokorrak .....	68-69
4.1.2. Ahoko datu klinikoak .....	69-70
4.1.3. Implanteen datu klinikoak .....	70-74
4.2. Azterketa genetikoa .....	75-79
4.2.1. Analisi orokorra .....	75-76
4.2.2. Analisi genetikoa eta arrisku-faktoreak .....	77-79
4.3. Azterketa zitologikoa .....	80-93
4.3.1. Analisi orokorra .....	80-88
4.3.1.1. Material-kopurua .....	80
4.3.1.2. Zelula epitelial ezkatatsuak .....	80-82
4.3.1.3. Detritusa .....	83
4.3.1.4. Mikrobiota .....	84-85
4.3.1.5. Hematiak .....	86
4.3.1.6. Hantura-zelulak .....	86-88
4.3.2. Analisi zitologikoa eta datu klinikoak .....	89-91
4.3.3. Sentikortasunaren eta espezifikotasunaren analisisia .....	92-93
4.4. Azterketa mikologikoa .....	94-101
4.4.1. Analisi orokorra .....	94-101
4.4.1.1. Ahoko irakuzketaren lagina .....	94-95
4.4.1.2. Fluido periinplantarioko paper-punten lagina .....	96-98
4.4.2. Analisi mikologikoa, datu klinikoak eta datu zitologikoak .....	99-101
4.5. Erregresio logistiko bitarra .....	102-103
5. Eztabaida .....	105-126

5.1. Emaidza epidemiologiko eta klinikoei dagokienez .....	105-108
5.2. Emaidza genetikoei dagokienez .....	109-114
5.3. Emaidza zitologikoei dagokienez .....	115-122
5.4. Emaidza mikologikoei dagokienez .....	123-126
6. Ondorioak .....	128-129
7. Bibliografia .....	131-182
8. Laburdurak .....	184-187
9. Eranskinak .....	189-213
9.1. 1. artikulua. Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Setien-Olarra A, Aguirre-Urizar JM, Marichalar-Mendia X. Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis. Int J Implant Dent 2022;8(1):1-9. ....	189-198
9.2. 2. artikulua. Lafuente-Ibanez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar J. A systematic review on the implication of Candida in peri-implantitis. Int J Implant Dent 2021; 7(1):1-9. ....	199-208
9.3. <i>Arrayean</i> sartutako proteina ez-espezifikoen SNPak: taldekako analisi konparatiboa. ....	209-211
9.4. Hantura-erantzuna eta hezur-birmoldaketaren proteinen SNPak. Analisisa arrisku-faktoreen arabera: periodontitisaren aurrekaria. ....	212
9.5. Aldagai zitologikoen arteko korrelazio-analisisa. ....	213



## 1. SARRERA

Ahoko osasuna gizakiaren bizi-kalitatearen adierazle argia da (Petersen, 2003). Hortz-terapiaren lehen zantzuak Goi Paleolito Arokoak dira (K.a. 9000), eta patologia kariogenikoa eta ahalegin konpontzaileak erakusten dituzten hondakin hominidoetan agertzen dira (Lukas eta Pastor 1988; Oxilia et al., 2015). Hala ere, ahoko nahasmenduei buruzko lehen tratatuak, periodontitisa barne, antzinako Greziakoak dira (K.a. 1200-146) (Guven, 2017).

Askoz geroago (K.o. 600), Amerikako aborigen maiak galdutako hortzak maskorrekin ordezkatzeari ekin zioten (Malvin, 1985). Haatik, ez zen XVIII. mendearen amaiera arte izan, Hunter doktorea hilotz-hortzak jartzen hasi zenean ohandze hortz gabeetan (Milton, 1988).

Lehen hortz-inplante metalikoak (iridio-platinoa) Greenfield doktoreak asmatu zituen XX. mendearen hasieran (1913) (Greenfield, 1991); eta ondoren (1930), kromo-kobaltoko aleazioekin eta altzairu herdoilgaitzarekin ordezkatu zituzten Strock anaiek (Abraham, 2014).

Gaur egun ezagutzen dugun inplantologia modernoa 1965ean sortu zen, Brånemark irakasleak titaniozko lehen inplante hariztatua jarri zuenean (Brånemark, 1977). Terapia berri horrek osteointegrazioaren kontzeptua sustatu zuen: "Hezur bizi ordenatuaren eta karga-eramaile den inplante baten azaleraren arteko zuzeneko lotura estrukturala eta funtzionala." (Brånemark, 1985). Une horretatik aurrera, material desberdinez egindako hortzetako inplanteen sistema ugari garatu dira, haien portaera biologikoa eta funtzionala hobetzeko, bai eta hortzik ez duten pazienteen bizi-kalitatea hobetzeko ere.



Euskal Autonomia Erkidegoan (EAE), Haurren Hortzak Zaintzeko Programa (PADI) ezartzeak, kontsumorako uraren fluorizazioarekin batera, nabarmen murriztu du patologia infekzioso kariogenikoaren prebalentzia, baina gaixotasun periodontalak bere horretan dirau (Gobierno Vasco, 2019). “Gaixotasun periodontal” izenak periodontoaren ehun bigun zein gogorrei eragiten dioten nahasmendu multzo bat biltzen du. 2017an Chicagon ospatu zen Ameriketako Periodontzia Akademiaren eta Europako Periodontzia Federazioaren arteko azken bilerak (Caton et al., 2018), periodontitisa faktore anitzeko gaixotasun infekzioso gisa hartzen du, biztanleriaren %50i baino gehiagori eragiten diona, eta hortzen inguruan hezur-galera eragiten duena, edentulismora eramanez.

Egun, 65 urtetik gorako Espainiako biztanleen % 25,5ek bakarrik mantentzen du hortzhaginen erdia ahoan, eta % 11,6k erabateko edentulismoa pairatzen du (Bravo Pérez et al., 2020). Bestalde, Munduko Osasun Erakundeak (MOE) (WHO, 2019) Espainiako batez besteko bizi-itxaropena 82 urtekoa dela adierazi du. Datu horiek guztiek ahoko osasunak, haren diagnostikoak, tratamenduak eta kontrolak oraindik ere espainiarren bizi-kalitatea balioesteko garrantzi handia dutela azpimarratzen dute.

MOEren Munduko Aho-hortzetako Osasunari buruzko Txostenak (Petersen, 2003) ahoko osasunak gizakien bizi-kalitate orokorrean duen zeregin esanguratsua nabarmentzen du: “Garezurreko eta aurpegiko konplexuak hitz egiteko, irribarre egiteko, musu emateko, ukitzeo, usaintzeko, dastatzeko, murtxikatzeko, irensteko eta minez oihu egiteko aukera ematen digu. Gainera, mikrobio-infekzioen eta ingurumen-mehatxuen aurkako babesa ematen du. Ahoko gaixotasunek eskolako, laneko eta etxeko jarduera murrizten dute, eta, horren ondorioz, urtero milioika ikasketa-ordu eta lan-ordu galtzen dira mundu osoan. Gainera, gaixotasun horien eragin psikosozialak nabarmen jaisten du pertsonen bizi-kalitatea.”

Hortz-inplanteen bidezko errehabilitazio-tratamenduaren helburu nagusia paziente hortz gabeei ahoko funtzioa itzultzea da, sistema finko eta egonkor baten bitartez. Aitzitik, terapeutika horrek ondorio kaltegarriak eduki ditzake. Izan ere, denborarekin konplikazio biologiko desberdinak agertu dira, pazienteen bizi-kalitatea mugatzen dituztenak, garrantzitsuena periinplantitisa (PI) izanik.

Periinplantitisa “Baldintza eta Gaixotasun Periinplantarioen” taldeko nahasmendu konplexu bat da, hortz-inplanteen % 50i arte eragiten diona eta masailezurreko hezur-euskarriaren galera baldintzatzen duena, askotan errehabilitazio-tratamenduaren porrota baldintzatuz (Zitzmann eta Berglundh, 2008). Zoritxarrez, oraindik ez dira argi eta garbi ezagutzen patologia periinplantario garrantzitsu honetan inplikaturako eragile etiopatogenikoak, partzialki onartutako patogenia infekzioso eta pazientearen arrisku-faktoreez gain, hala nola periodontitisaren aurrekaria, tabako-kontsumoa eta diabetes mellitusaren pairamena (Schwarz et al., 2018).

Periinplantitisaren diagnostikoa kliniko-erradiologikoa da eta hurrengoko parametroak hartzen ditu kontuan: zundaketa delikatu baten ondorengo odoljariora edota zornea,  $\geq 6$  mm-ko zundaketa sakonera eta inplantearen hezur barneko osagaiaren  $\geq 3$  mm-ko hezur galera marjinala. Hala ere, ezaugarri horien ebaluazioan sortzen diren desberdintasun subjektiboek eta PIren definizioan izandako aldaketek asko oztopatu dezakete haren diagnostikoa (Zitzmann eta Berglundh, 2008; Lang eta Berglundh, 2011; Rosen et al., 2013, Albrektsson et al., 2016; Tarnow, 2016).

Ebidentzia zientifikoaren arabera, plaka bakterianoaren metaketa eta periodontitisaren aurretiko historia PIren arrisku-faktore garrantzitsuenak dira (Renvert eta Quirynen, 2015). Alabaina, baldintza horien eraginpean dauden gizabanako guztiek ez dute gaixotasuna sufritzen. Hori dela eta, PIa garatzen lagunduko lukeen sentikortasun

genetiko fenomenoa bat dagoela proposatu da azken urteotan (Esposito et al., 1998; Laine et al. 2006; Eguia et al., 2018; Lafuente-Ibáñez de Mendoza et al., 2022).

Horregatik guztiatik, maiz gertatzen den gaixotasun honen etiopatogeniari buruzko datuak lortzeak eta bere diagnostikoa hobetzeak PIa izateko arriskua duten pazienteak identifikatzeko eta diagnostiko goiztiarra egiteko aukera emango liguke. Gainera, PIren agerpena prebenitzen lagunduko liguke, neurri terapeutiko eraginkorragoak ezarriz, eta horrekin guztiarekin hartz-inplanteekin tratatutako pazienteen bizi-kalitatea hobetuz.

## 1.1.Hipotesia

PIa duten pazienteek hantura-erantzuna eta hezur-birmoldaketa arautzen duten proteinen polimorfismo genetiko espezifikokoak dituztela frogatzeko azterlan gutxi egin dira Espainia mailan, eta bakar bat ere ez EAEn.

Badakigu PIa gaixotasun infekzioso polimikrobianoa dela, non agente infekziosoen multzo batek jarduten duen, batez ere bakterioek, esate baterako *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denitcola*, *Tanarella forsythia*) (Canullo et al., 2015; Shibli et al., 2007). Hala ere, beste mikroorganismo batzuen ekintzak ere garrantzia izan dezake, fungikoak barne (Alcoforado et al., 1991). Ildo periinplantarioa *Candida spp.* kolonizatzeko hobi ezin hobe denez (Arabiah et al., 2019), interesgarria izango litzateke onddo honek PIren sorreran zer eginkizun duen jakitea.

Mukosa peri-inplantarioaren azterketa zitologikoaren bitartez, mikrobio-kolonizazioaren kantitatea eta kalitatea, hantura-erantzun zelularren kantitatea eta kalitatea, epitelioaren eragin-maila, beste elementu batzuen presentzia, eta abar, ezagutu ditzakegu. (Patton et al., 2008, Pontoriero et al., 1995; Belibasakis, 2014; Javier Vallejo Doktorego Tesia, 2017). Hain zuzen ere, metodologia erraz horrek oso informazio baliotsua eman dezake PIren diagnostiko goiztiarrari, haren progresioari, kontrolari eta patogeniari buruz.

Azterlan honen abiapuntuko hipotesia periinplantitisaren etiopatogenia multifaktoriala dela da. Bertan banakako sentikortasuna egongo litzateke, hanturaren eta hezur-birmoldaketaren polimorfismo genetiko zehatzekin erlazionatuta. Bestalde, PIren patogenian, bakterio periinplantopatogeno klasikoek ez ezik, *Candida spp.* generoko onddoek ere parte hartuko lukete. Gainera, ehun periinplantarioetatik lortutako zitologia

metodologia baliagarria izango litzateke gaixotasun periinplantarioa garaiz diagnostikatzeko eta kontrolatzeko.

## **1.2.Helburuak**

Gaur egun ez dago, periinplantitisaren testuinguruan, polimorfismo genetiko espezifikoen presentzia, onddoen inplikazio patogenikoa eta alderdi zitologikoa hirurak batera aztertu dituen ikerketarik.

### **• Helburu nagusia**

Periinplantitis diagnostikoa duen Euskal Autonomia Erkidegoko biztanlerian ikertzea, polimorfismo genetikoaren patroi bereizgarria, *Candida spp.*ren presentzia faktore patogeniko bezala, eta mukosa periinplantario gaixoaren karakterizazio zitologikoa.

### **• Bigarren mailako helburuak**

1. Hanturarekin eta hezur-metabolismoarekin lotutako polimorfismo genetiko espezifikoak dauden jakitea, periinplantitisa duen biztanleria honetan.
2. Periinplantitisari lotutako ehun periinplantarioen analisi zitologikoaren ezaugarriak ezagutzea, biztanleria honetan.
3. *Candida spp.* generoko onddoek periinplantitisean duten kolonizazio-maila eta inplikazioa antzematea, biztanleria honetan.
4. Azterketa genetiko, zitologiko eta mikologikoetan lortutako emaitzak haien artean eta periinplantitisaren datu kliniko nagusiekin elkartzea, biztanleria honetan.

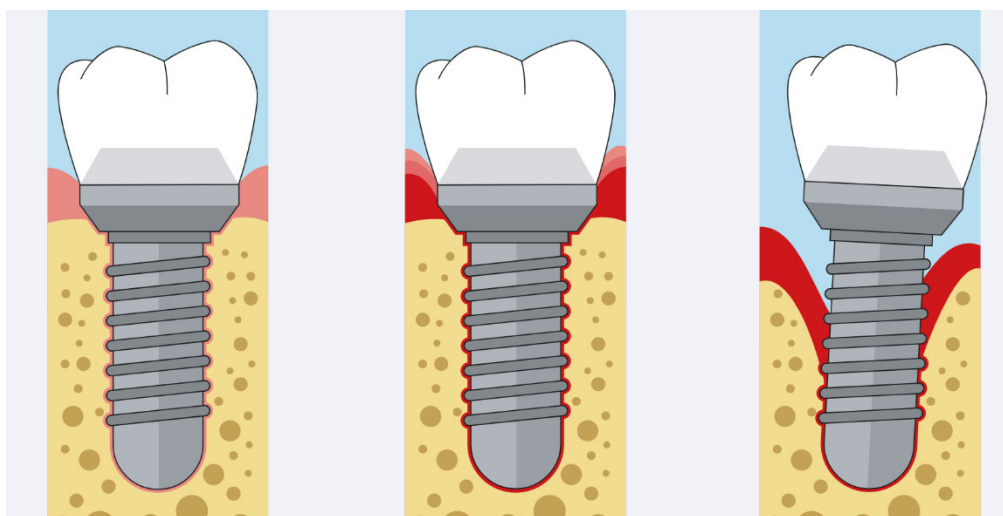


## 2. AURREKARIAK

### 2.1. Gaixotasun periinplantarioa

Hortz-inplanteen bidezko terapiarekin lotutako konplikazio biologiko nagusiak mukositis periinplantarioa (MPI) eta periinplantitisa (PI) dira (Lee et al., 2017).

Hortz-haginak dituzten pazienteetan gingibitisa periodontitisaren aurretikoa den moduan, MPIa PIa baino lehenago agertzen ohi den eta ehun bigun periinplantarioei bakarrik eragiten dien hantura-koadro itzulgarria da, terapia erraz batekin tratatzen dena (Heitz-Mayfield eta Salvi, 2018). Mantentze-terapia periodontalera jotzen duten pazienteen MPIa PIa bihurtzeko tasa % 18koa da, eta kontrol hitzorduetara joaten ez diren banakoena, berriz, % 43,9koa (Costa et al., 2012) (**1. irudia**).



**1. irudia.** Baldintza eta Gaixotasun Periinplantario nagusien eskema grafikoa (Europako Periodontzia Federazioa, 2022. <https://www.efp.org/dental-implants/peri-implant-diseases/> ). Osasun periinplantarioa (ezkerra), mukositis periinplantarioa (erdia) eta periinplantitisa (eskuina).

Hortz-inplanteak inguratzen dituen masailezurreko hezurrean garatzen den hezur-birmoldaketa birxurgapen erantzun fisiologiko moldagarria da, 1,7 mm-ra irits daitekeena baldintza normaletan, eta giza organismoaren beste alde batzuetan gertatzen den antzekoa



da, beste jarduera terapeutiko batzuk egin ondoren (aldakako protesiak, belaunekoak, etab.) (Steenberghe et al., 2011).

Ehun konektiboaren eta mukosa periinplantarioaren arteko loturak hartz-haginen inguruan dauden ezaugarri kliniko eta histologikoen pareko elementuak erakusten ditu; haatik, zelula- eta zuntz-mailako desberdintasunak ere baditu (Ivanovski eta Lee, 2018). Ehun konektibo periinplantarioak, titaniorekin harreman estuan, hezur-gailurraren periostiotik mukosaren ertzean txertatzen diren sorta kolageniko trinko handien sare bat erakusten du (Ivanovski eta Lee, 2018). Zuntz horiek lotura-epitelioan proiektatzen eta orientatzen direnean, noranzko perpendikularra hartzen dute zementu erradikularretik hortzen kasuan; eta inplanteetan, aldiz, norabide paraleloa (Berglundh et al., 2004; Bergunsh et al., 2011). Zuntzen antolamenduaren aldaketa horrek garrantzi kliniko handia du; aho-barrunbeko agente infekziosoekiko (lotura-epitelioa) eremu periostikoa estaltzen duen hesi biologikoa ez baitago hortz-inplanteetan (Shimono et al., 2003).

Hasiera batean, PIren lehen kasuak “funtzionamenduan dagoen hortz-inplantearen inguruko hantura-erreakzioak, euskarri-hezurra galerarekin” gisa definitu ziren (Albrektsson eta Isidor, 1994). Ondoren, PIren hainbat arrisku-faktore eta irizpide diagnostiko ezarri ziren, hala nola hezur-galera marjinala (HGM) eta zundaketa-sakonera (ZS) handia (Ismael, 2001; Heitz-Mayfield 2008; Lindhe eta Meyle 2008; Zitzmann eta Berglundh 2008). Halaber, tratamendu kirurgikoaren (inplantearen gainazala deskontaminatzea) eta ez-kirurgikoaren (antibiotikoak erabiltzea) konbinazioa nahasmendu honen tresna terapeutikorik onena dela adierazi da urterekin (Clarke et al., 2008; Renvert et al., 2008).

MPIa gingibitisaren kontraparte peri-inplantarioa bada ere, PIa periodontitisaren prozesu desberdina zela lehen adostu zen lehen aldiz Periodontziako 7. *Workshop*-ean (2011), bai

grabitateari zein hantura-osagaiei dagokienez (Lang eta Berglundh 2011). Periodontitisarekin konparatuta, hantura lesioen hedapen apikala handiagoa da PJan (ZS handiagoa) eta zelula osteoklastiko eta inflamatorio akutu gehiago daude (makrofagoak eta polimorfonuklearrak). (Heitz-Mayfield eta Lang, 2010). Horregatik, periodontitisean agertzen den babes-autolimitazioaren faktorea ez litzateke PJan existituko (Berglundh et al., 2011).

Egun, PJa “Baldintza eta Gaixotasun Periiplantarioak” izeneko taldearen barruko nahasmendutzat hartzen da, eta mukosa periiplantarioaren hantura eta euskarri-hezurraren galera progresiboa ditu ezaugarri (Schwarz et al., 2018). PJa faktore anitzeko hanturazko gaixotasun infekziosoa da, genero-lehentasunik gabea, inplanteekin tratatutako pazienteen % 50i eragiten diona eta, kasu askotan, errehabilitazio-tratamenduaren porrota baldintzatzen duena (Lindhe et al., 2008; Lang et al., 2011; Tomasi et al., 2012; Schwartz et al., 2018).

Hortz-inplanteen kolonizazio bakterianoa inplanteak jarri eta denbora gutxira gertatzen da (Apse et al.1989). Hortz-inplanteak dituzten pazienteen ahoko mikrobiotari buruzko lehen deskribapenak Filadelfiako Unibertsitateko (Estatu Batuak) Periodontzia eta Inplantologia taldeak egin zituen 80ko hamarkadaren hasieran, eremu iluneko mikroskopia-azterketen bidez (Rams eta Link, 1983). Talde horrek inplante osasuntsuetako bakterioak (kokoak) eta PIdun inplanteenak (espiroketak) bereizi zituen (Rams et al., 1984). Geroago, Goteborgeko Unibertsitateko (Suedia) ikertzaileek koko eta bazilo itxurako mikrobiota mugikorraren presentzia ere aitortu zuten, ildo periiplantarioen % 93-94an (Adell et al., 1986; Lekholm et al., 1986).

Hortz-inplanteei lotutako profil mikrobiologikoa 1986an deskribatu zen (Lekholm et al., 1986), gehiengoa bakterio Gram positiboak izanik, kokoak (*Streptococcus sanguis*,

*Streptococcus mitis*, *Streptococcus acidominimus*) eta baziloak (*Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*); baina baita bakterio Gram negatiboak ere, kokoak (*Veillonella parvula*) eta baziloak (*Fusobacterium nucleatum*, *Campylobacter rectus*). Ondoren, beste periinplantopatogeno espezifiko batzuen agerpena aitortu dira, hala nola *Treponema denticola*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* eta *Prevotella intermedia* (Nakou et al., 1987; Apse et al., 1989). Mombelli et al. (1987) *Fusobacterium spp.*, *P. intermedia*, *P. gingivalis* eta *A. actinomycetemcomitans* bakterio anaerobio negatiboek PIDun inplanteetan duten presentzia handiagoa frogatu zuten lehen ikertzaileak izan ziren. Alcoforado et al.-en (1991) emaitzak antzekoak izan ziren, *Candida albicans* lehen aldiz isolatuz PIDun inplanteak zituzten pazienteetan.

Urteen poderioz, hotz-inplante osasuntsuen eta PIDun inplanteen arteko alde mikrobianoak gero eta gehiago ezaugarritu dira. Osasun periinplantarioan dauden hortz-inplanteek bakterio Gram positibo gehiago dituzte (*Gemella morbillorum*, *S. sanguis*, *Actinomyces spp.*), eta PIa dutenek beste mikroorganismo espezifiko batzuk dituzte (*Prevotella nigrescens*, *Staphylococcus epidermidis*, *Tannerella forsythia*, *Mycoplasma salivarium*, etab.) (Becker et al., 1990; Rosenberg et al., 1991; Danser et al., 1997; Listgarten et al., 1999; Hultin et al., 2002; Schwarz et al., 2015). Era berean, berezitasunak deskribatu dira konplexu “berdean” (*A. actinomycetemcomitans*), “laranja” (*F. nucleatum*, *Peptostreptococcus micros*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *C. rectus*), “gorrian” (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *T. forsythia*) eta “moratuan” (*Streptococcus gordonii*, *S. sanguinis*) (Canullo et al., 2015). Konplexu gorriaren eta laranja presentzia handiagoa da PIan, eta morearena eta berdearena inplante osasuntsuetan (Shibli et al., 2007).

Ikerketa honek guztiak PIa nahasmendu infekzioso polimikrobianoa dela frogatu du, non hamaika bat agente infekziosok jarduten duen modu sinergikoan: *P. gingivalis*,

*Staphylococcus aureus*, *T. forsythia*, *P. nigrescens*, *Treponema socranskii*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus midis*, *Haemophilus influenzae* (Salvi et al., 2007; Charalampakis et al., 2012; Persson eta Renvert, 2013). Are gehiago, patogeno espezifikoaren konbinazioak ere identifikatu dira (*P. gingivalis* + *T. forsythia* + *T. denticola*, *M. salivarium* + *V. parvula*, + *P. gingivalis* + *P. micra*) (Albertini et al., 2015; Schwarz et al., 2018). Hala eta guztiz ere, oraindik ez da frogatu Plari lotutako profil mikrobioano espezifikorik; eta bakterioen presentzia, periodontitisak jotako hortzetan ikusitakoarekin alderatuta, txikiagoa da (Padial-Molina et al., 2016).

Prozesu infekzioso periinplantario heterogeneo honek ehun bigun periinplantarioen hantura baldintzatzen du, edema, gorritzea, hortzoi-gaingoratzea, odoljariora (BOP), ZS eta HGM sortaraziz (Schwarz et al., 2018) (**2. irudia**).



**2. irudia.** Periinplantitis kasua. Beheko masailezurreko dauden 6 inplanteren itxura klinikoa, periinplantitisarekin, plaka bakterianoaren metaketa handiarekin eta BOPekin.

PIren lehen seinale klinikoak 0,5 mm-ko HGMrekin lotzen dira, eta inplanteen % 66raino ager daitezke, inplanteak jarri ondorengo bigarren edo hirugarren urtetik aurrera (Derks et al., 2016). Aitzitik, gaixotasunaren hasiera lehen urtean ere gerta daiteke kasuen % 5ean (Schwarz et al., 2018). HGM honen handiagotzea ez da lineala eta edozein unetan areagotu daiteke gaixotasunean zehar (Albouy et al., 2008; Albouy et al., 2009). Hezur-galeraren eredu ohikoena zirkunferentziala eta uniforme da (% 55), ahoko eta mihiko hezur-taulak mantenduz (Schwarz et al., 2007).

ZS areagotua ( $\geq 6$  mm) PIa duten pazienteen % 66raino agertzen da, eta gaixotasun honen diagnostikoan erabiltzen den parametro kliniko garrantzitsuenetariko bat da, batzuetan BOP batekin batera (Derks et al., 2016); haatik, odoljariora ez da PIren seinale diagnostiko patognomonikoa, MPIko kasuetan edota osasun periinplantarioan ere ager daitekeelako, (Derks et al., 2016). Hala ere, mukosa peri-inplantarioaren odoljariora PI agerpenaren eta progresioaren adierazle nagusia da, baita haren lehen zeinua ere: beraz, bere maneia funtsezkoa da PIren lehen mailako prebentzioan (Tonetti et al., 2015). PIren bigarren mailako prebentzioa terapiaren fase aktiboa osatu ondoren terapia periodontal laguntzailea jarraitu behar duten arrisku-taldeezi zuzenduta dago (Tonetti et al., 2015).

PIren garapenari dagokionez, hauek dira arrisku-faktore nagusiak: 1) Periodontitisaren aurretiko historia klinikoa, eta 2) Plaka kontrol edota mantentze-planaren jarraipen txarra (Schwarz et al., 2018).

Periodontitis aurrekaria duten pazienteek 6 mm baino gehiagoko ZS (% 6-% 27) eta 3 mm baino gehiagoko HGM (% 11-% 15) handiagoa dute, aurretiko konpromiso periodontal gabeko pazienteek baino (ZS: % 2; HGM: % 5); baita MPIa PIa bihurtzeko tasa handiagoa ere (% 31) (Roccuzzo et al., 2010; Roccuzzo et al., 2012). Hortz-inplanteen bidezko terapian zehar periodontitis aktiboa egoteak 4 eta 7 aldiz handiagotu

dezake PI garatzeko arriskua (Maximo et al., 2008; Koldslund et al., 2010; Koldslund et al., 2011; Casado et al., 2013; Renvert et al., 2014; de Araujo Nobre et al., 2015; Daubert et al., 2015; Dalago et al., 2017).

Mantentze-terapia funtsezkoa da PIa maneiatzeko, ez bakarrik pazienteak monitorizatzeko, baizik eta nahasmendu hori prebenitzeko ere bai (Aguirre-Zorzano et al., 2015). Hortz-inplanteen egoera kontrolatzeak bakterio-plakaren metaketa balioestea ahalbidetzen du, bai eta ZSren eta HZMren egoeran gertatzen diren aldaketak ere, terapia goiztiarra ezartzeko. PIren hasiera epe laburrean edo luzean gara daitekeenez, pazienteen kontrol aktiboa egitea funtsezkoa da. Mantentze-terapiara joaten ez diren pazienteek PIa izateko 14 aldiz arrisku handiagoa dutela adierazi da, PIren intzidentzia % 44koa izanik eta mantentze-terapiara joaten diren pazienteen kasuan, ostera, % 18koa (Ferreira et al., 2006; Rokn et al., 2017).

Tabako-ohiturak eta diabetes mellitusak PIren garapenerakin duten arrisku-faktore erlazioa ez dago erabat agerian oraindik (Schwarz et al., 2018). Tabakoaren kontsumoa HGMren sustatzaile argia bada ere, desadostasunak daude hainbat azterlanen artean (Lindquist et al., 1996; Rinke et al., 2011). Alde horiek hainbat arrazoiengatik izan daitezke, hala nola pazienteen tabako-kontsumoa behar bezala islatzeko ahobatezkotasun ezagatik, edota periodontitis aurrekaria bezalako beste aldagai batzuk kontuan ez izateagatik. Bestalde, PIa diabetes mellitus mota IIrekin lotzen duten ikerketa gehienek (Taylor eta Borgnakke 2008) pazienteen ahozko datua baino ez dute jasotzen, eta oso gutxi maila gluzemikoa eta HbA1c. Horregatik guztiagatik, azterketa homogeneizatu gehiago behar dira.

Azkenengo urteotan, beste patologia sistemiko batzuk PIren agerpenarekin erlazionatzen ere saiatu egin da, esate baterako gaixotasun kardiobaskularra eta artritis erreumatoidea, baina lortutako ebidentzia oraindik oso mugatua izan da (Renvert et al., 2014).

PIren etiopatogenia azaltzen saiatzen den beste ordezeko bide bat hartz-inplanteen inguruko tokiko faktoreei dagokio (Schwarz et al., 2018): errestaurazio-zutabearen posizio okerra, lehengoratzearen gaintentsioa, inplantearen kokapen desegokia, diseinu protesiko okerra, gainkarga oklusala, titanio-partikulen presentzia, zementu-hondarrak, etab. (Eriksson et al., 1984; Kozlovsky et al., 2007; Trisi et al., 2009; Lin et al., 2013; Trisi et al., 2014; Sridhar et al., 2016). Faktore horiek guztiek ahoko higie zuzena egiteko ahalmena zailtzen dute, bakterio-plaka metaketa eta HGM erraztuz. Era berean, oklusio eta alboko gehiegizko gainkargek inplantearen inguruko hasierako hezur-birmoldaketa areagotu dezakete (Kozlovsky et al., 2007; Heitz-Mayfield et al., 2004; Sridhar et al., 2016); eta zementuaren presentziak ehun periinplantarioen hantura eta biofilm bakterianoen eraketa handitu (de Brandao et al., 2013; Schwarz et al., 2014; Canullo et al., 2016; Staubli et al., 2017).

Hala eta guztiz ere, orain arte aipatutako arrisku-faktoreak dituzten gizabanako guztiek ez dute PI bat garatzen (Serino et al., 2009; Caton et al., 2018). Hori dela eta, periinplantitisa agertzeko beste elementu mesedegarri bat paziente batzuen sentikortasun genetiko berezia izango litzateke, PIa garatzea erraztuko lukeena (Esposito et al., 1998; Eguia et al., 2018).

## 2.2.Sentikortasun genetikoa gaixotasun periinplentarioan

Bariazio genetikoa giza aniztasunaren oinarria da (Wang et al., 1998). Polimorfismo genetikoak (PG) DNAREN sekuentziaren puntu jakin batean kokatzen diren eta biztanleriaren % 1 baino gehiagotan agertzen diren aldaketa indibidualak dira (Smith et al., 2005). Nukleotido bakar baten polimorfismoak (SNP) sarrien gertatzen diren PGak dira (Smith et al., 2005), eta giza genoma osoan banatzen dira, batez beste 1 SNP 1000 base pare bakoitzeko (Landegren et al., 1998). Mutazio genetiko mota hau gaixotasun espezifiko batean inplikaturako geneak eta proteinak identifikatzeko erabil daiteke (Landegren et al., 1998).

Zelula-motaren arabera, alterazio genetikoak lerro germinaleko (hereditarioak) edo linea somatikoko (ez-hereditarioak) zeluletan gerta daitezke, honela sailkatuz: ordezkapenagatiko mutazioak (base bat beste batekin aldatzea) eta txertatze- edo delezio-mutazioak (base pare bat edo gehiago gehitzea/ ezabatzea) (Karki, 2015).

Gaixotasun periodontalaren jatorriari lotu den sentikortasun genetikoa asko aztertu da iraganean (Michalowicz et al., 2009). Orain, hainbat ikerketa talde ezberdinek Piren testuinguruan duen papera aurkitzen saiatzen ari dira (Dereka et al., 2010; Eguia et al., 2018).

Espero zitekeen bezala, P1an gehien aztertu diren genotipoak interleukinenak (IL) dira, batez ere IL1 $\beta$  eta IL1 $\alpha$ , prozesu infekzioso-inflamatorio periinplentarioa aktiboki erregulatzen dutenak baitira (Rogers et al., 2002; Gruica et al., 2004; Jansson et al., 2005; Laine et al., 2006; de Boever eta de Boever, 2008; Hamdy eta Ebrahim, 2007; Lachmann et al., 2007; Jaworska-Zaremba et al., 2008; Montes et al., 2009; Dirschnabel et al., 2011; Melo et al., 2012; Vaz et al., 2012; García-Delaney et al., 2015; Cosyn et al., 2016;



Fernandes et al., 2017). IL6ko eta IL10ko SNPak ere nabarmen ikasi dira (Campos et al., 2005; Gurol et al., 2011; Melo et al., 2012; Rakic et al., 2017; Ribeiro et al., 2017).

Hantura-erantzuna gizakiaren biziraupenari lotutako fenomeno fisiologiko eta organikoa da, eta lau etapa ditu, zelula-seinaleztapenerako bide desberdinekin: 1) estimulua eragitea, 2) estimulua detektatzea, 3) bitartekaritza zelularra eta molekularra, eta 4) ehun-konponketa (Mogensen, 2009). Bide horiek aktibatzea hanturazko erantzuna eragiten duen elementuaren izaeraren arabera da. Agente patogeno bakterianoen kasuan, sortzetiko immunologia-sistemaren hartzaileek ezagutzen dituzte, hala nola *Toll* motako hartzaile makrofagikoak (TLR), aldi berean zitokina inflamatorioak sintetizatu eta jariatzen dituztenak (IL1, IL6, TNF) (Mogensen, 2009). Ondoren, bitartekari horiek basodilatazioa, polimorfonuklearren estrabasazioa, plasmaren metaketa eta kimiotaxi leukozitarioa eragiten dute; patogeno inbaditzaileak suntsitzeko magma inflamatorio bat sortuz (Medzhitov, 2010). Hanturazko erantzuna agente eragilea ezabatu eta homeostasi tisularra berriz ezartzen denean amaitzen da, kimiozina eta zitokinen bitartez, eta zelulek ehunaren sendaketa hasteari ekiten diote (Serhan eta Savill, 2005).

Inflamazioa gizakion gaixotasun kroniko askoren patogenia arrunta da, diabetes mellitusa, artritisa, zenbait minbizi, etab. (Libby, 2007). Piren kasuan, patogenoei lotutako patroi molekularrak izeneko egitura-konplexuek (PAMP) zelula-barneko ur-jauzi erantzuna sorrarazten dute (Akira et al., 2001). Estimuluaren (mikrobio-hondakinetako produktuak, IL1, IL6 eta TNF $\alpha$ ) eta hartzailearen (TLR, IL1R, IL6R, TNFR) arteko interakzio molekular horrek zelula barneko seinaleztapen-bide garrantzitsuak aktibatzen ditu, hantura-prozesua erregulatzen dutenak eta zitokinen ekoizpena eta hantura-zelulen erreklutamendua mantentzen dutenak (Hoffman et al., 2006). Bide horien alterazioak, hanturazko erantzuna aztorazten dute.

Horregatik, proteina horiek sintetizatzen dituzten geneen SNPek ezohiko erantzun zelularra eta inflamatorioa eragin dezakete, hortz-inplanteen osteointegrazio-ahalmena murriztuz. Hantura-molekula horietako bakoitza tresna diagnostiko eraginkorra izan daiteke hainbat gaixotasunetako biomarkatzaile potentzial gisa (Lindahl et al., 2000; Shlipak et al., 2003; Goldstein et al., 2009; Miller et al., 2009; Gupta et al., 2012; Czaja, 2014), eta baita PIkoa ere (Lachmann et al., 2007).

IL1a hantura-erantzunaren bitartekari gisa jarduten du, eta, aldi berean, hezur-birxurgapena eta zelula kanpoko matrizearen suntsipena sustatzen du matrizearen metaloproteinasak aktibatuz (MMP) (Graves eta Cochran 2003). IL1a pisu molekular txikiko ILa da, eta bere funtzio biologiko nagusiak sortzetiko immunitatearen parte dira. Hiru forma desberdin ditu: IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$  eta IL1RN (Dinarello, 2009). IL1 $\beta$ -ko SNP ohikoenak eta PIari dagokionez gehien aztertu direnak 3953. [IL1 $\beta$  (+3953)] eta 511. [IL1 $\beta$  (-511)] posizioetan kokatzen dira (Laine et al., 2006; García-Delaney et al., 2015), eta IL1 $\alpha$ -koarena, aldiz, 889. posizioan [IL1 $\alpha$  (-889)]. Orain arte, azterlan batek ere ez du frogatu IL1 $\beta$  (+3953) edota IL1 $\alpha$  (-889) SNPen eta PIren presentziaren artean harremanik dagoenik. Hala ere, lan horien metodologia heterogeneoa izan da, ziurrenik ebaluazio diagnostikoan dauden ezberdintasunen ondorioz, eta parametro garrantzitsu batzuk beti baloratu ez direlako, hala nola periodontitis aurrekaria edo tabakoaren kontsumoa.

Japonian egindako ikerketek bakarrik ikusi dute zuzeneko lotura IL1 $\beta$  (-511) eta HGMren presentziaren artean (Shimpuku et al., 2003; Lin et al., 2007). Suedian eta Egipton egindako beste lan batzuek, berriz, lotura estatistikoki esanguratsua aurkitu dute IL1 $\beta$  (+3945) eta IL1 $\alpha$  (-889) genotipoa konposatuaren eta PIren (Laine et al., 2006; Hamdy et al., 2011). Nolanahi ere, meta-analisi berri batek ez du inolako loturarik adierazi PIren eta IL1 $\beta$  (+3953) edota IL1 $\alpha$  (-889) SNPen presentziaren artean (Lafuente-Ibáñez de

Mendoza et al., 2022; **1. eranskina**). Alabaina, P1ren eta IL1 (-511) C/C genotipoaren presentziaren arteko arrisku-lotura egongo litzateke.

IL10a hanturaren aurkako beste zitokina indartsu bat da, molekula inflamatorioen (IL1, TNF $\alpha$ ) eta zelula kanpoko matrizearen sintesia murrizten duena (gelatinasa, kolagenasa); osteoblastoen desberdintzea bultzatzen duen eta osteoklastoen eraketa inhibitzen duen heinean (Zhang et al., 2014). Orain arte, IL10 (-1081) SNPa P1a zuten Alemaniako paziente erretzaileetan edota periodontitis aurrekaria dituzten banakoetan soilik erlazionatu da (Petkovic-Curcin et al., 2017).

Beste zitokina esanguratsu bat IL6 da. Izan ere, haren ekintza proinflamatorioak RANKLren adierazpena eragiten du hezur-prozesu birxurgatzailean zehar (Yoshitake et al., 2008). Hala ere, oraindik ez da frogatu bere polimorfismoren eta P1ren arteko lotura dagoenik (Melo et al., 2006; Ladeira-Casado et al., 2013; Petkovic-Curcin et al., 2017).

Hezur-metabolismoa prozesu biologiko dinamiko konplexua da, gizakiaren umetoki barruko seigarren astean hasten dena, lehen hezurren eraketaren bitartez, eta lau zelulatalde handik parte hartzen dute: osteoblastoek, osteozitoek, hezur-estaldurako zelulek eta osteoklastoek (Davies, 2003). Elementu horien elkarreraginak aposizioaren eta hezur-birxurgapenaren arteko oreka fisiologikoari eusten dio (Florencio-Silva, 2015).

Osteointegrazio periinplantarioa fenomeno fisiologikoa da, non ostalari baten elementu tisular desberdinek biomateriala (titanioa) jatorrizko masailezurreko hezurarekin modu egokian lotzea ahalbidetzen duten (Brånemark, 1985). Prozesu hori, batez ere, hortz-inplantea jartzerakoan lortzen den egonkortasun primarioaren (mekanikoaren) eta jartzen den hezur-ehun motaren araberakoa da.

Hezur-ehuna bi multzo handitan bereiz daiteke: hezur kortikala (I. motako hezurra) eta hezur harrotua (IV. motako hezurra) (Clarke, 2008). Hezur marjinalaren morfologia eta arkitektura funtsezko elementua da osteointegrazio inplantarioaren arrakastan (Insua et al., 2017). Hezur kortikalak hasierako egonkortasun handiagoa ematen du eta hezur harrotuak, berriz, egitura baskular gehiago dituzenez, zelula-bereizketaz arduratzen da, hezur-inplanteen interfasea etorkizunean integartzeko (Davies, 2003). Izan ere, hezur kortikal periinplantarioa modu laminarrean (zuzenean) birsortzen da, lehendik dagoen hezuraren gainean kokatutako osteoblastoetatik abiatuta; eta hezur trabekularra birsortzeak, lehendik dauden trabekulak birmoldatzea ez ezik (urrutiko osteogenesisia), inplantearen gainean kokatutako hezur muineko populazio zelular osteogeniko berrien bitarteko (ukipen-osteogenesisia) hezur-eraketa azkarra ere badakar (Osborn eta Newsely, 1980; Davies, 2003).

Hortz-inplanteen kirurgiak martxan jartzen duen seinale zelular eta molekular multzoak, osteoklastoen apoptosis, osteoklastogenesisia, hezur-birxurgapena sustatzen duten RANKL motako molekulen jariaketa eta zelula kanpoko matrizearen zuntz kolagenikoen degradazioa eragiten du (hezur-estaldurako zelulak) (Insua et al., 2017). Bestalde, plaketen degranulazio-prozesuan, hezur-muineko zelula osteogenikoetarako molekula kimiotaktiko ugari jariatzen dira (PDGF, TGF $\beta$ ) (Gonçalves et al., 2016), angiogenesisia eta erantzun osteogenikoa mantentzea dituztenak (Graves et al., 1989). Fibrina-mintzaren finkapenak eta haren inplantearen gainazaleko iragazkortasunak, lehen zelula osteogenikoak ainguratzeko oinarria ematen dute, zelula berriak odol-uholdearen bidez iristeko bide bat bezala funtzionatuz (Borie et al., 2015).

Hezuraren birmoldaketarekin zerikusia duten gehien ikertu diren proteinak eta haien SNPak BMP4, BRINP3, CD14, FGF3, FGF-10, LTF, OPG, eta RANKL dira (Santos et

al., 2004; Casado et al., 2015; Rakic et al., 2015; Coelho et al., 2016; Zhou et al., 2016; Ribeiro et al., 2017).

Hezurretako proteina morfogenetikoak (BMP) eta fibroblastoen hazkunde-faktoreak (FGF) osteoguraso-zeluletan eta zelula fibroblastikoetan kokatutako hazkunde-faktoreak dira, eta hezurak birmoldatzean osteoblastoen arteko bereizketa erregulatzeaz arduratzen dira (Anderson et al., 2000). Azken boladan, BMP4, FGF3 eta FGF10eko zenbait SNPek Pirekin erlazionatuta egon daitezkeela ikusi da, Brasilgo pazienteetan behintzat (Casado et al., 2015; Coelho et al., 2016).

Laktoferrina (LTF) epitelio-isurietan eta granulu neutrofilikoetan dagoen glikoproteina transferrina mota bat da, ugaritze eta bereizketa osteoblastikoa estimulatzen duena (Naot et al., 2005). Alabaina, Brasilgo ikerketa-talde batek bakarrik LTFren SNPa aztertu du Piren testuinguruan, elkartze positiborik aitortu gabe (Doetzer et al., 2015).

Bereizketa osteoklastikoa desberdintze *cluster* 14ak (CD14) monozitoetan erdiesten duen prozesu bat da, eta haren jarduera osteoklasto helduetan amaitzen da RANKLak osteolastogenesisia induzitzen duenean (Massey eta Flanagan, 1999; Sørensen et al., 2007). Azken ikerketek Piren eta CD14 (-159) SNParen arteko erlazioa adierazi dute, RANKL (-438) SNParena ez bezala (Kadkhodazadeh et al., 2013; Rakic et al., 2015; Petkovic-Curcin et al., 2017; Ribeiro et al., 2017; Reis et al., 2020). Hortaz, hortz-inplanteen osteointegrazioan parte hartzen duten osteoklastoak haien bereizketaren hasierako faseetatik aldatuta egon litezke.

Osteoprotegerina (OPG) osteoblastoen gainazalean adierazten den beste molekula bat da, RANKaren hartzaile antagonista gisa jarduten duena, hezurak berriz xurgatzea saihestuz (Wright et al., 2009); baina bere OPG (1181C) SNPa ez da Pirekin lotu (Kadkhodazadeh et al., 2012; Zhou et al., 2016).

Azterketa-bide oso iradokitzailea bada ere, oraindik ez da frogatu sentikortasun genetikoaren benetako inplikazioa eta SNP espezifikoen presentzia PIren garapenari dagokionez. Eraitza kaskar horiek biztanleriaren heterogeneotasunaren ondorio dira, eta baita PIa diagnostikatzeko erabilitako irizpide diagnostikoenak ere. Horregatik, azterketa gehiago egin behar direla uste dugu, ondo hautatutako lagin handiagoekin, diseinu metodologiko eguneratua eta zehatzekin, eta SNP ugari aztertuz. Ildo horretan, IL1eko polimorfismoei buruzko ikerketa-lan bakarra dago Espainiako biztanlerian (García-Delaney et al., 2007), are gehiago azpimarratuz azterketak egiteko beharra.

### **2.3.Zitologia esfoliatiboa gaixotasun periinplantarioan**

Periinplantitisaren egungo diagnostikoa kliniko-erradiologikoa da, eta aurretik aipatutako datu semiologikoen balorazioan oinarritzen da, hala nola ZS, HGM, BOP eta zornearen presentzia (Zitzmann eta Berglundh 2008, Lindhe eta Meyle 2008, Lang eta Berglundh, 2011; Schwartz et al., 2018). Hala ere, diagnostiko-datu horiek lortzea eta interpretatzea zaila izan daiteke maiz, nahasteak eraginez eta diagnostiko zuzen goiztiarra ezartzea eta gaixotasunaren tratamendu eta jarraipen egokia ezartzea eragotziz (Albrektsson et al., 2016). Gainera, parametro diagnostikoen aldagarritasun eta subjektibotasun handia erakutsi dezakete balioztatzeke momentuan, eta horrek zaildu egiten du osasuna eta gaixotasun periinplantarioa bereiztea (Lachmann et al., 2013, Albrektsson et al., 2016). Are gehiago, diagnostiko-irizpideen eta PIren definizioen inguruan dauden desadostasunen ondorioz, haren benetako prebalentziaren zifrak oso aldakorrak eta eztabaidagarriak dira, askotan (Zitzmann eta Berglundh, 2008; Lang eta Berglundh, 2011; Rosen et al., 2013, Albrektsson et al., 2016; Tarnow, 2016).

Azterketa histopatologikoa mukosa periinplantarioaren hantura-nahasmenduak eta bestelako lesioak diagnostikatzeko *gold standard* proba diagnostikoa da (Sotorra et al., 2020). PIko lesio inflamatorio-erreaktiboek epitelio ezkatatsuaren eta ehun konektibo fibrozelularraren hiperplasia erakusten dute, erantzun inflamatorio akutu (polimorfonuklear neutrofiloak eta makrofagoak) eta kroniko (linfuzitoak eta zelula plasmaticoak) handiarekin (Sanz et al., 1991; Berglundh et al., 2004; Sotorra et al., 2020).

Ehun periinplantarioetan gertatzen diren aldaketa morfologikoak zelula-mailan ikus daitezkeenez, garrantzitsua da PIren hasierako faseetatik diagnostikoa egitea erraztuko liguketen prozedura sinpleak, odolgabeak eta erabilgarriak garatzea, hala nola karrakatze bidezko zitologia esfoliatiboa (Hayama et al., 2005, Patton et al., 2008). Zitologia

esfoliatiboa metodologia histopatologiko erraza da, esfoliazio bidez edota karrakatze bidez ehunetatik modu naturalean askatzen diren zelulen ebaluazio mikroskopikoan oinarritzen dena, horiek finkatu eta tindatu ondoren (Acha et al., 2005).

Karrkatze bidezko zitologia esfoliatiboaren lehen aplikazio diagnostiko aitortua Julius Vogelek egin zuen 1843an, bularreko minbizitik lortutako laginetan zelula gaiztoak behatu zituenean. Geroago, George Nicholas Papanicolaouk (1925), zitologia modernoaren aitak, umetoki-zerbixeko kartzinomaren diagnostikorako teknika diagnostiko eta pronostiko funtsezko gisa jarri zuen (Saumann, 1994). Papanicolaouk lagina hartzeko, finkatzeko eta tindatzeko sistema berria ezarri zuen. Are gehiago, umetoki-zerbixeko minbiziari lotutako dauden alterazio zitologiko mota desberdinen nomenklatura diseinatu zuen (Pap Test), zitologia kliniko moderno eta prebentiboa estandarizatzeko oinarri gisa balio izan duena (Marchetti, 1969).

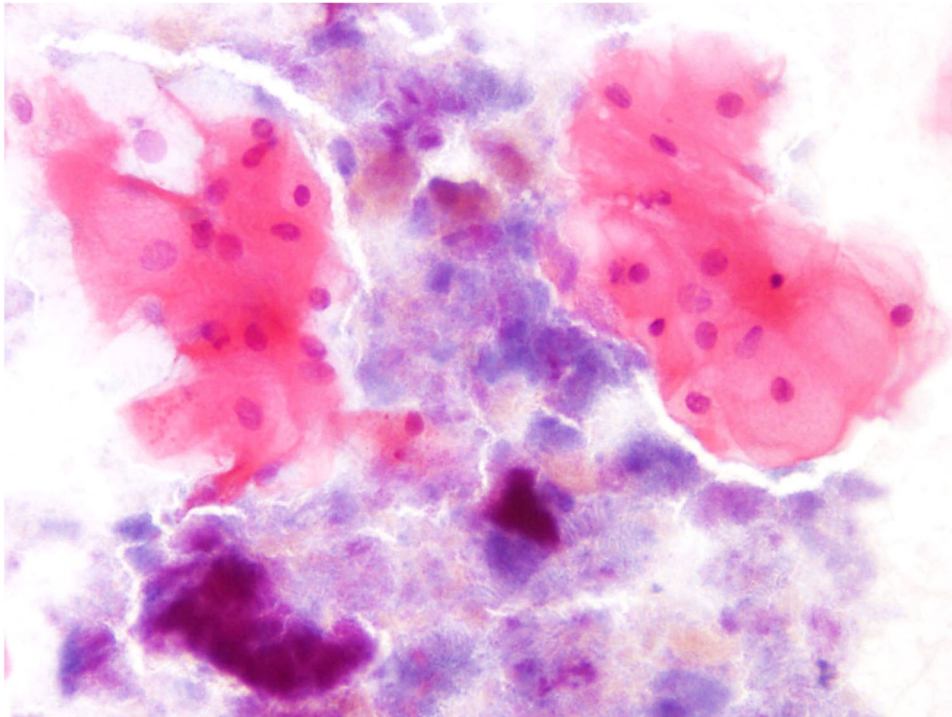
Ahoko mukosa epitelio geruzatu ezkatatsu laua da, eta keratinizazio-maila desberdinak erakutsi ditzake. Hortzoi eta mukosa periimplantarioaren kasuan, epitelio ezkatatsu horrek epitelio-gandor luzeak eta azaleko ortokeratinazio fina aurkezten ditu. Papanicolaouren teknika zitologikorekin, keratinozitoak epitelio geruzetan duten posizioaren arabera ikus eta bereiz ditzakegu (Rusu et al., 1973). Horrela, zelula basalak urdin-berdeak agertzen dira, 1:2ko nukleo-zitoplasma ratioarekin eta kromatina sakabanatuko nukleo biribilarekin; zelula parabasalak urdinak dira, esferiko-kuboidalak, eta kromatina nuklearra ondo definituarekin; tarteko zelula poligonalak urdinak dira, eta nukleo txikiagoarekin; azaleko zelulak arrosatuak dira eta nukleo piknotiko txikiarekin; eta gainazaleko zelula kornifikatuak eosinofilikoak dira eta nukleorik gabe.

Stahl (1967) hortzoiko keratinozitoen alterazio inflamatorio-morfologikoak zitologia esfoliatiboaren bidez ikus zitezkeela deskribatu eta frogatu zuen aurrena izan zen (Lange,



1965). Zoritxarrez, ahoko zitologia esfoliatiboa gaixotasun periodontal konbentzionalarekin lotzen duen informazio zientifiko gutxi dago, eta are gutxiago hortz-implanteen inguruko nahasmenduekin (Tetsch eta Schone, 1976; Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014; Javier Vallejo Doktorego Tesia, 2017).

Hortzoi klinikoki “osasuntsu” batean, hedatu zitologikoa garbi agertzen dira, zelula ezkatatsuak eosinfilikoak dira eta ez da leukozitorik ikusten (Carraro et al., 1965, De Boever et al., 2006, Fürst et al., 2007, Albertini et al., 2015). Aldiz, hortzoi-ehunaren hantura egoeretan, mukosa zeharo aztoratzen denez, keratinozitoen alterazio morfologikoak ikusi daitezke (handitze nuklearra, bakuolizazioa, kromatina irregularra, nukleo piknotikoa, nekrosia, etab.); bai eta neutrofiloen, leukozitoen eta eritrozitoen ugaritzea (Saki et al., 1960) (**3. irudia**).



**3. irudia.** Mukosa periinplantarioa karrakatzearen ondoriozko zitologia-hedatua, mukosaren geruza desberdinetako zelula ezkatatsuekin (arrosa-laranja) eta bakterio-kolonizazioarekin (more-urdina) (Papanicolaou 20x).

Gaixotasun periinplantarioei dagokienez, MPIren hasierako faseetan kokoak, baziloak eta espiroketak ugaritzen dira (Pontoriero et al., 1995). Aitzitik, mikrobiotaren kantitatea modu esanguratsuan lotzen da MPIren garapenarekin hortz-inplanteak kargatu ondorengo 4 hilabeteetatik aurrera; beraz, behaketa zitologikoak PIa garatzeko arrisku handiagoa duten pazienteak identifikatzen lagun diezaguke (Costa et al., 2012).

Gainera, mukosa peri-inplantarioaren odoljariora datu kliniko erabakigarria da PIren progresioan (Tonetti et al., 2015). Hori dela eta, elementu hori aitortzea PIren lehen mailako prebentzioan ere funtsezkoa izan daiteke; baita hantura-zelulak identifikatzea ere. PIDun mukosa peri-inplantarioaren zitologia hedatuek neutrofiloen eta linfozitoen osagai handiagoa erakuts dezakete (Olmedo et al., 2013; Belibasakis, 2014; Lucchese et al., 2014). Hala eta guztiz ere, ez dago inplante osasuntsuen eta PIa duten inplanteen mukosa periinplantarioaren karakterizazio kliniko-zitologikoa egin duen ikerketa-lanik.

Aurrekari horiek ikusita, karrakatzeko bidezko azterlan zitologikoak osasun periinplantarioaren eta gaixotasun periinplantarioaren profil zitologiko espezifiko bat ezartzeko aukera eman diezagukeela uste dugu, PIren diagnostiko goiztiarra egiten eta gaixotasun periinplantarioaren kontrola hobetzen lagunduko ligukena.

## 2.4. *Candida spp.* gaixotasun periinplantarioan

Gaixotasun infekziosoek osasun publikoan duten eragina aspalditik aztertu da (Smith et al., 2012). Ahoko nahasmendu infekzioso nagusiek, eta zehazki ehun periodontalek, ez dute normalean patologia infekzioso sistemikoen larritasun bera sortzen, baina ondorio garrantzitsuak izan ditzakete.

*Candida spp.* generoko onddoek eragindako ahoko infekzioari buruzko lehen erreferentziak antzinako Grezian hasten dira, Hipokratesek lehen aldiz ahoko kandidiasia deskribatu zuenean *Corpus hippocraticum*-eko “*De las epidemias*” laugarren tratatuan (K.a.: 475 y 466 aC), “aftek eragindako ahoko kandididiasia” gisa. Haatik, Fredrik Berg ahoko kandidiasia infekzio mikotikoa zela egiaztatu zuen lehen zientifikoa izan zen, eta baita gaixotasuna diagnostikatzeko onddoaren presentzia ezinbestekoa dela ere (Knoke eta Bernhardt, 2006). Ondoren, Charles Phillippe Robin mikologo frantsesak *oidium albicans* (*albicans* = zuritu) moduan sailkatu zuen eta behin betiko *Candida albicans* taxonomia Christine Marie Berkhout botanikak eman zion bere tesian 1923an, latinezko *toga candida* izenetik abiatuta (erromatar senatariek erabilitako tunika zuria) (Holland eta Vinh, 2009).

*Candida*-ren ondoriozko mikosiak azalekoak (ahoko mukosa, mukosa genitala, larruazala, mukokutenoa) edo sakonak (miokarditisa, septizemia, okularra, biriketakoak, etab.) izan daitezke (Molero et al., 1998).

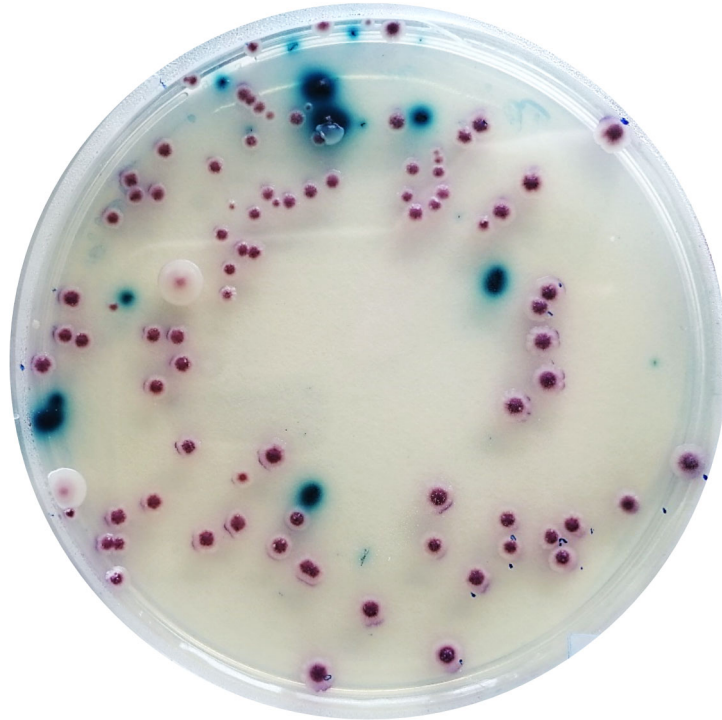
*Candida spp.* generoko onddoek 100 espezie fungiko baino gehiago dituzte, eta horietatik gehienak endosimbiosian bizi dira gizakietan (Ciurea et al., 2020). *Candida spp.*-ak eragindako infekzioek, immunogabezia duten pazienteei eragiten diete batez ere; izan ere kandidiasia “paziente gaixoaren gaixotasuna” aintzat hartzen da. Kasuen % 80 inguru *C. albicans* infekzioak eragindakoak dira; beste espezie batzuek gauzatutako infekzioak

(*Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*) gero eta ohikoagoak diren arren (Aguirre, 2002; Mark eta Roberts, 2016).

*Candida spp.* ahoko infekzio bihurtzea eta kandididiasia eragitea patogenoaren eta ostalariaren faktore desberdinen menpe dago (Aguirre, 2002). Patogenoak ostalariaren defentsa immunologikoa saihesten saiatzen da, birulentzia faktore desberdinen bitartez, *Candida spp.*-ren kasuan atxikitze gaitasuna, aldaketa morfologikoa, biofilmen eraketa, entzima hidrolitikoaren jariatzea eta moldagarritasun metabolikoa (Ciurea et al., 2020). Aldi berean, ostalariaren sortzetiko immunitateak (neutrofiloak eta makrofagoak) *Candida spp.*-ren (karbohidratoak, azido nukleikoak, polisakaridoak, etab.) eta PAMPen berariazko elementu molekularrak ezagutzen ditu, erantzun immunologikoa modulatu duten hainbat zitokina proinflamatorio eta kimiozinen askapena abiaraziz (Lionakis eta Netea, 2013).

Ostalariaren aho-mukosako zelulei atxikitze, *Candida* onddoek haien zelulen gainazalean dauden proteinak erabiltzen dituzte, eta, ondoren, ahoko zelulak inbaditzen dituzte endozitosi induzituaren eta sartze aktiboaren bidez (Hoyer eta Cota, 2016). Oso patogenoak diren anduek hazkunde hariztatuekin eta biofilmen eraketarekin lotutako geneak adierazten dituzte ere bai (Hoyer eta Cota, 2016) (**4. irudia**).

Ingurumeneko pH-aren aldaketek, oxigeno-kontzentrazioek, karbono dioxidoak edota glukosa-kontzentrazioak *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis* eta *C. tropicalis* patogenoen biofilm eraketa gauzatzen dute (Haynes, 2001). Haien hifek hainbat toxina peptidiko jariatzen dituzte, kandalisina esate baterako, epitelioa kaltetzen dutenak eta berezko erantzun immunologikoa aktibatzen dutenak hazkunde epidermikoaren faktorearen eta hantura-zelulen erreklutamenduaren bidez (Moyes et al., 2016).



**4. irudia.** Candida Chromogenic Agar/CONDA plaka (CondaLab ®). Kultibo mistoa: *C. albicans* (berdea), *C. krusei* (zuri-arrosa) eta *C. glabrata* (bioleta).

*Candida spp.*-ak entzima hidrolitikoak sintetizatzeko gaitasuna ere badu: proteinasak (Saps), fosfolipasak (PL) eta lipasak (Lip), diana-zelularen mintza ahultzen dutenak, haren lisia induzituz eta ostalariaren sistema immunologikoari eraso eginez (Schaller et al., 2005). Zehazki, *C. albicans* jariatzen dituen proteasa aspartikoek (SAPP1-SAPP1a eta SAPP1b, SAPP2 eta SAPP3) jardura makrofagoa modulatzeko erabiltzen dute eta osagarriaren ur-jauzia eteten dute hantura erantzunean (Singh et al., 2019).

Biziraupena handiagotzeko helburuarekin, *C. albicans* espezieak unitate mikrobiano konplexuak osatzen ditu, *biofilm* izeneko legami-itxurak eratuz (Finkel eta Mitchell 2011; Ciurea et al., 2020). Geroago, zelula anitzeko komunitate hori hiru dimentsioko egitura bihurtzen da (glukosa, manosa), eta hainbat espezie fungiko eta bakteriano *biofilm* misto oldarkoragoak eta konplexuagoak eratzen ditu (Chandra et al., 2001; Silva et al., 2011; Fanning eta Mitchell, 2012; Schlecht et al., 2015). Horrela, *C. albicans* eta *C.*

*glabrata* hifen arteko elkarketak *C. glabrata* ugaltzea eta *S. aureus* kolonizatzea errazten du. Paraleloki, *S. aureus*-ek *C. glabrata*-ren ugaritzea erreprimitzen du, eta *C. tropicalis*-ek *C. albicans*-en biofilmen eraketari eragiten dio (Tati et al., 2016). Aho-mukosan, *C. albicans* eta beste espezie ez-*albicans*-en kolonia mistoak (*C. krusei*, *C. glabrata*) kolonia sinpleak baino arinagoak direla ere adierazi da (Rossoni et al., 2015).

Mikroorganismoek *biofilmak* osatzeko duten gaitasuna faktore intrintsekoek (atxikitze-proteinak kodetzen dituzten geneen adierazpena, seinaleztapen-sistemak, etab.) eta estrintsekoek (substratuaren osaera, tenperatura, bakterio antagonistak edo sinergikoak, etab.) eragiten dute. (Wimpenny et al., 2000; Mba et al., 2020). Haatik, *biofilmen* egitura aldatu egiten da espezie batetik bestera. *C. albicans*-en biofilma bi geruzetan antolatzen da: bata blastosporazko basala, eta bestea hifetako matrize lodia; *C. tropicalis*-ena, berriz, harizpi-itxurako geruza bakarra da; *C. parapsilosis*-ena blastospora, legami edota pseudohifen geruza bakarra edo multikapa da; eta *C. glabrata*-rena blastosporen geruza bakarra edo multikapa da (Silva et al., 2011). Are gehiago, matrizearen osagaiak ere desberdinak dira: *C. tropicalis*-ena proteina eta karbohidrato gutxi ditu, *C. parapsilosis*-ena proteina gutxi eta karbohidrato ugari, eta *C. glabrata*-ena proteina ugari eta karbohidrato gutxi (Araújo et al., 2017).

Gainazal ez-organikoak, hala nola hortz-inplanteena, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* eta *C. parapsilosis* biofilmak sortzeko ainguraketa eta nitxo ezin hobeak dira (Sherry et al., 2017). Horren aurrean, IgA, lisozima, muzina eta laktoferrina proteina defendatzaileak inplantearen gaineko atxikipena eta ugalketa blokeatzen saiatzen dira (Pereira-Cenci et al., 2008; Lauren Bach eta Epstein, 2009).

Infekzioa eragiteko, legamiak *biofilm*etatik askatzen dira, eta beste nitxo batzuetara barreiatzen dira karbono-iturrien eta pH-aren aldaketen bidez (Uppuluri et al., 2010).

Hifen eta legamien bizitza baliagarria antzekoa da, murriztu egiten da baina zahartu ahala (glukogenoaren metaketa, DNA haustea, etab.) (Fu et al., 2008; Potocki et al., 2019). Modu horretan, estres-egoeretan, *Candida spp.*-ko zelulak apoptosian sartzen dira, klonik gazteenei bizirauten eta populazio mikotikoaren birulentzia hobetzen laguntzen dieten substantziak askatuz (Herker et al., 2004; Phillips et al., 2006; Lin eta Austriako, 2014).

Gaixotasun periinplantarioaren profil mikrobiologikoa gehienbat bakterianoa den arren, PIren agerpenean eta garapenean beste agente patogeno batzuk inplikaturik egon daitezke, baita fungikoak ere, *Candida spp.* adibidez. Onddo honek beste gainazal metaliko batzuk (belauneko edo aldakako protesiak) kolonizatzeko eta haien gainean *biofilm*ak sortzeko gaitasuna ezaugarri patologiko ohikoa da (Cobo et al., 2017). Ildo periinplantarioa hobi ekologiko ezin hobea da *Candida spp.* Aitzitik, orain arte egindako azterketak eskasak izan dira; ez baitituzte faktore garrantzitsu batzuk kontuan hartu, hala nola CFU kopurua, kolonia mistoen presentzia, *Candida spp.* kolonizazioaren eta parametro kliniko desberdinen arteko erlazioa, etab.

*Candida spp.* banako osasuntsuen % 60k baino gehiagok ahoan duten onddo komentsala da, batzuetan mukosa-infekzioaren koadroak sorraziz (Aguirre, 2002). Ildo subgingibala espezie fungikoentzako babesleku ere izan daiteke, hantura periodontala mantenduz (Urzúa et al., 2008; de la Torre et al., 2018; Alrabiah et al., 2019). *Candida spp.*-ak hezurrarekiko ukipen estuan dagoen inplanteen eremura atxikitze gaitasuna duenez, gaixotasun periinplantarioen agerpenean eta progresioan ere parte har dezaketela proposatu da azken boladan (Alrabiah et al., 2019).

Berrikuspen sistematiko berri batek (Lafuente-Ibáñez de Mendoza et al., 2021; **2. eranskina**) *Candida spp.*-ren agerpena fluido periinplantarioan diagnostiko klinikoarekin zerikusirik ez duela aipatu du; bai osasunean zein PIa duten pazienteek *Candida spp.*

baitute (Kilic et al., 2014; Peñarrocha-Oltra et al., 2015; Gomes et al., 2017; Mencio et al., 2017; Alsahhaf et al., 2019; Ju et al., 2019). Autore batzuen arabera, onddo honen presentzia handiagoa da gaixoen artean (% 3-76) osasuntsuen artean baino (% 9-50); hala ere, ez dago alde estatistikoki esanguratsurik (Rosenberg et al., 1991; Leonhardt et al., 1999; Albertini et al., 2015; Canullo et al., 2015; Schwarz et al., 2015; Bertone et al., 2016; Mencio et al., 2017).

Fluido periinplantarioan isolatu diren *Candida* espezie esanguratsuenak hurrengoak dira: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *C. krusei*, *Candida lusitaniae*, *C. glabrata*, *Candida kefyr* eta *Candida norvegensis* (Kilic et al., 2014; Canullo et al., 2015; Gomes et al., 2017). Horzdun pazienteek edentuloek baino *Candida spp.* zenbaki handiagoak dituzte (Leonhardt et al., 1999; Canullo et al., 2015), baita barra bidez atxikitako hortzeriak dituzten pazienteak ere (Alsahhaf et al., 2019); beraz, hortz- eta metal-azalerak faktore garrantzitsuak izan litezke onddoak sartzeko eta kolonizatzeke.

Nahiz eta ez dakigun *Candida spp.*-ek zehazki zer eginkizun duen gaixotasun periinplantarioaren hasieran, agente patogeno hau PIko fase aurreratuagoetan inplikaturik egon daitekeela uste da, mikroinguru bakterianoa jada ezarrita dagoenean (Cavalcanti et al., 2016). Are gehiago, Gomes et al., (2017) deskribatu zutenaren arabera, inplantea *Candida*-ren kantitatea handiagoa da inplanteak jarri eta 8 hilabete geroago, 4 hilabeteko zifrekin alderatuta.

*Candida* generoko onddoak beste mikroorganismo batzuekin batera ere isolatu dira fluido periinplantarioko laginetan: *C. albicans* + *V. parvula*, *C. albicans* + *T. forsythia*, *C. albicans* + *M. salivarum*, *C. albicans* + *P. gingivalis* eta *C. albicans* + *P. micra*, *C. dubliniensis* + *M. salivarum*, *C. dubliniensis* + *V. parvula*, *C. dubliniensis* + *S. aureus*, *C. dubliniensis* + *P. micra* eta *C. dubliniensis* + *T. forsythia* (Canullo et al., 2015).



Kolonizazio peri-inplantarioaren ostean, *Candida*-k hezur-galeran duen inplikazioari buruzko ezagutzak azaltzea zaila izan daiteke. Alabaina, poltsa peri-inplantarioaren anaerobiosiak *Candida*-ren birulentzia sustatzen duela badakigu, Sap-en jarduera areagotuz, erantzun immunea modulatu, hantura-estimulua mantenduz eta beste peri-inplantopatogeno batzuk erakarrit (Rosa et al., 2008; Naglik et al., 2003; Sardi et al., 2008; Thein et al., 2007).

Espainiako biztanlerian egindako azterlan bakarra, fluido periinplantarioko laginekin, *Candida* kasuen % 13,5ean dagoela frogatzen da qPCR erabiliz (Canullo et al., 2015). Hala ere, orain arte ez da ondo honen horren karakterizazio kliniko-mikrobiologikorik egin, PIDun eta PIRik gabeko hartz-inplanteak konparatuz; ezta beste ezaugarri kliniko garrantzitsuak kontuan hartu dituenik ere: hortzeria mota, inplanteen ZS, HGM eta kokapena, pazienteen aurrekari medikoak, etab. Bestalde, hazkunde fungikoaren kantitatea CFU bidez ere ez da aztertu.

Aurrekari horiekin guztiekin, *Candida spp.* generoko ondoek gaixotasun periinplantarioa izatearekin duten erlazioari buruzko azterketa zehatzago gehiago diseinatu behar dira, haien benetako inplikazioa ezagutzeko.



### **3. MATERIAL ETA METODOAK.**

#### **3.1. Pazienteak**

Euskal Herriko Unibertsitateko (EHU) Odontologia Klinika Zerbitzuaren Periodontzia eta Osteointegraziozko Unitatera eta *Centro Odontológico Médico-Quirúrgico* (COMQ) implanteak mantentzeko terapia eta kontrola jasotzera joaten diren 161 pazienteri buruzko kasu-kontrol behaketa-azterketa erretrospektiboa egin dugu.

Proiektu honek giza subjektuak inplikatzeko dituen Ikerketa Medikorako Printzipio Etikoei buruzko Helsinkiko Adierazpenaren printzipioak jarraitzen ditu, eta EHUKo Ikerketarako Etika Batzordeak onartu du (GIEB: M10/2016/057, CEIAB/2016/180). Azterketan parte hartu aurretik, parte-hartzaile guztiek baimen informatu bat sinatu zuten; eta haien datu pertsonalak eta laginak kasu bakoitzari esleitutako kode batekin gorde dira fitxategiaren arduradunaren ordenagailuan (Ana María García de la Fuente Doktorea), sarbide-gakoarekin eta segurtasun-kopiarekin disko gogor batean.

Laginaren tamaina kalkulatzeko, POISSONen hurbilketa erabili da. 0,05eko alfa arriskua eta 0,2ko beta arriskua onartuz gero, 78 kasu eta 78 kontrol behar dira, gutxienez 3ko *odds* ratioa detektatzeko. Kontrol-taldean esposiziopean daudenen tasa 0,5ekoa dela onartu dugu, eta jarraipen-galeren tasa % 15ekoa.

##### **3.1.1. Sartzeko eta baztertze irizpideak**

Azterlanean parte hartu zuten parte-hartzaileentzako inklusio-irizpideak honako hauek izan ziren: 1) 18 urte baino gehiago izatea eta 2) Gutxienez urtebeteko hortz-implante bat izatea. Baztertze-irizpideak, berriz, honako hauek izan ziren: 1) hortz-implanteak jarri aurreko 6 hilabeteetan antibiotikorik edo hezur-metabolismoarekin edota ehun

periodontalen orbaintzearekin zerikusia duten farmakorik jaso ez izana, eta 2) Haurdun edo edoskitzaroan egotea.

Kasu Taldean (KAT) hortz-inplanteekin tratatutako eta PIa diagnostikatutako pazienteak sartu ziren, gutxienez hortz-inplante batean; eta Kontrol Taldean (KOT) hortz-inplanteekin tratatutako pazienteak, PI diagnostikorik gabe (**5-6 irudiak**). Paziente guztiak kontrol eta mantentze terapian zeuden, ahoko higienari buruzko jarraibideekin, eta klorhexidina antiseptikoko irakuzketa edota gelen erabilera barneratzen zituena (Lang et al., 2000).

PIren diagnostikoa Ameriketako Periodontzia Akademiak eta Europako Periodontzia Elkarteak ezarritakoa izan zen (Caton et al., 2018):

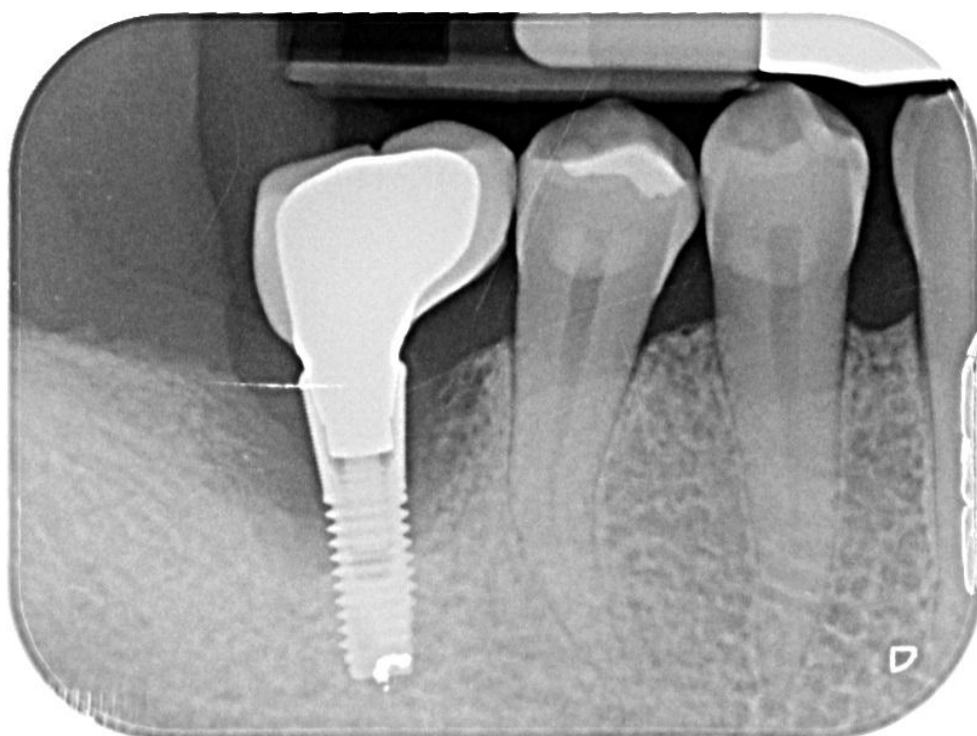
- Zundaketa delikatu baten ondorengo odoljariora edota zornea.
- ZS handitzea, aurreko miaketekin alderatuta.
- HGM handitzea hasierako hezur-birmoldaketarekin konparatuta.

Aurreko erregistro klinikorik ez bazegoen, hurrengoko parametroak hartu ziren kontuan:

- Zundaketa delikatu baten ondorengo odoljariora edota zornea.
- $\geq 6$  mm-ko ZS periinplantarioa.
- Inplantearen hezur barneko osagaiaren  $> 3$  mm-ko HGM.



**5. irudia.** Periimplantitisa duen hortz-inplante baten itxura klinikoa (4.6 posizioa).



**6. irudia.** Periimplantitisa duen hortz-inplante baten itxura erradiografikoa (4.6 posizioa).

### 3.1.2. Protokolo klinikopatologikoa

Datu kliniko-patologikoak EHUKo Odontologia Klinika Zerbitzuaren Periodontzia eta Osteointegraziozko Unitatean eta COMQean bildu ziren.

Erreklutamendu-prozesuaren eta baimen informatuaren sinaduraren ostean, kasu eta kontrol guztietan berariaz diseinatutako protokolo klinikopatologiko bat bete zen, honako hauek jasotzen zituen:

- Datu orokorrak:

- Adina, generoa, segimendu-denbora (lehen inplantea jarri zenetik).
- Aurrekari medikoak: gaixotasun sistemikoak, alkohol-kontsumoa, tabako-kontsumoa. Tabakoaren ohitura balioztatzeko, paziente erretzaileak honela sailkatu ziren:  $\geq 10$  zigarro edo  $< 10$  zigarro egunean. Ikerketan parte hartu baino 10 urte lehenago tabako-kontsumoa utzi zuten pazienteak erretzaile ohizat hartu ziren.

- Ahoko datuak:

- Periodontitis aurrekaria.
- Edentulismoaren presentzia.
- Inplanteak: zenbakia eta posizioa, kolokazio-data, Pla agertu arteko denbora. Aztertutako hortz-inplante guztiak titaniozkoak, hariztatuak eta gainazal zimurtsukoak ziren. EHUKo inplanteak Straumann® (Basilea, Suitza), AstraTech® (Molndal, Suedia), Ticare Mozo Grau® (Valladolid, Espainia) eta BTI® (Gasteiz, Espainia) ziren; eta COMQ-koak Nobel Biocare® (Kloten, Suitza), Straumann® (Basilea, Suitza) eta AstraTech® (Molndal, Suedia).
- Datu periiinplantarioak: ZS, HGM, BOP, zundaketa ondorengo zornea.

- Datu erradiografikoak: HGM ebaluazioa, aho barneko erradiografia periapikalen edo aho kanpoko panoramikoekin egin zen, inplantea jartzeko unean eta kontroletan zehar.

## 3.2. Laginak jasotzea

Laginak EHUko Odontologia Klinika Zerbitzuaren Periodontzia eta Osteointegraziozko Unitatean eta COMQean jaso ziren.

### 3.2.1. Analisi genetikorako lagina

#### 3.2.1.1. Lagin genetikoa hartzea

Polimorfismo genetikoak aztertzeko, ahoko 2 lagin hartu ziren (**7. irudia**).

- Mukosa jugalaren eta mihiaren karrakatze bidezko lagin zitologikoa, minutu batez, nylonezko eskuila zitologiko batekin Rovers® Orcellex® (Lekstraat, Herbehereak). Eskuilatu ondoren, eskuila 2,5 mL-ko ur miliQ esterilean sartu zen 5 mL-ko *ependorf* hodi batean, eta -20°C-ko tenperaturan biltegitatu zen.
- Ahoko irakuzketaren bidezko lagin zitologikoa % 0,12ko 25 mL klorhexidina diluziorekin, minutu batez. Edukia 50 mL esterileko Falcon hodi batean jaso zen, eta -20°C-ko tenperaturan biltegitatu zen.



**7. irudia.** Laginak jasotzea. Material genetikoa erauzteko kita: Falcon hodia, % 0,12ko 50 mL klorhexidinarekin; *ependorf* hodia, 2,5 mL miliQ urarekin; eta arraspatze zitologikorako eskuila.

### 3.2.1.2. Lagin genetikoaren analisisia

- *DNAREN ERAUZKETA*

DNAREN ERAUZKETA Estomatologia II Sailaren Aho Patologia eta Medikuntzako Genetika Laborategian egin zen, Qiagen® (Hilden, Alemania) kit estandarrarekin.

Laginen desizoztea 37°C-ko bainu batean egin ziren, asalduran, zelulak berreskitzeko. Irakuzketaren laginean 5 mL hartu ziren, eta gainerako materiala -20°C-tan biltegitatu zen. Eskuilatze bidezko laginean, itsatsitako zelulak miliQ uretan askatu ziren, eskuila astinduz. Ondoren, eskuila 1,5 mL-ko *ependorf* hodi batean sartu eta -20°C-tan biltegitatu zen.

Eskuilaren kasuan DNA zuzenean atera zen, eta irakuzketaren laginerako, berriz, hainbat zentrifugazio-prozesu egin ziren pellet zelularra berreskuratzeko. Bi laginak 5.000 b/min-ko abiaduraz zentrifugatu ziren 15 minutuz, eta gainjalkina kendu zen.

DNA erauzteko protokoloa:

- 180 µL ATL *buffer* eta 20 µL proteinasa K gehitu laginari, eta irabiagailu (bortex) batean nahastu. Ondoren, 56°C-tan inkubatu lisi osoa egin arte (1-3 ordu).
- Beste 200 µL AL *buffer* gehitu, eta nahasketa 15 segundoz astindu berriro.
- 70 °C-tan inkubatu eta labur zentrifugatu 10 minutuz, tapako tantak kentzeko.
- 200 µL % 96-100eko etanola gehitu eta astindu 15 segundoz. Ondoren, pixka bat zentrifugatu estalkiaren hondarrak kentzeko.
- Nahasketa QIAamp zutabe txiki batean pipeteatu (2 mL-ko hodi biltzaile batean). Ondoren, 8000 b/min-ko abiaduraz zentrifugatu (6000 x g) minutu batez, eta hodi biltzailea duen gainjalkina baztertu.



- QIAamp erauzketa-zutabe txikia 2 mL-ko bilduma-hodi berri batean jarri eta 500  $\mu$ L AW1 *buffer* gehitu. Ondoren, 8000 b/min-ko abiaduraz zentrifugatu (6000 x g) minutu batez, eta gainjalkina baztertu.
- QIAamp erauzketa-zutabe txikia 2 mL-ko bilduma-hodi berri batean jarri eta 500  $\mu$ L AW2 *buffer* gehitu. Ondoren, abiadura handiengan zentrifugatu (14,000 b/min ) 3 minutuz, eta gainjalkina baztertu.
- QIAamp erauzketa-zutabe txikia 2 mL-ko bilduma-hodi berri batean jarri eta abiadura handiengan zentrifugatu minutu batez, AW2 *buffer*-ren hondarrak ezabatuz.
- QIAamp erauzketa-zutabe txikia 1,5 mL-ko hodi mikrozentrifugatu berri batean jarri, eta 200  $\mu$ L AE *buffer* edo ur destilatu gehitu. Ondoren, giro-tenperaturan inkubatu minutu batez, eta 8000 b/min-ko abiaduraz (6000 x g) zentrifugatu minutu batez, DNA diluitzeko.
- Azken urratsa errepikatu 100  $\mu$ L AE *buffer*ekin, DNAREN errendimendua handitzeko.

- *DNAREN kuantifikazioa*

DNAREN kuantifikazioa EHUko Estomatologia II Sailaren Aho Patologia eta Medikuntzako Genetika Laborategian egin zen, Xabier Marichalar eta Amaia Setien doktoreen zuzendaritzapean.

Horretarako, Thermo Scientific NanoDrop<sup>TM</sup> 1000 (Waltham, Estatu Batuak) espektrofotometroa erabili zen. Espektrofotometro horrek 1  $\mu$ L bolumeneko azido nukleikoen laginak kuantifikatzen ditu, zehaztasun eta erreproduzigarritasun handiarekin. Espektroa 220 nm-tik 750 nm-ra bitartean kulunkatzen da, eta lagina atxikitzeke azaleko tentsioa soilik erabiltzen du, kubetak eta laginari eusteko beste gailu batzuk erabiltzeko beharra kenduz.

DNA kuantifikatzeko 260/280 ratioa erabili zen (laginaren xurgapenaren erlazioa 260 eta 280 nm-tan). Xurgapen-erlazio hori DNAREN garbitasuna ebaluatzeko erabiltzen da. 1,8ko

erlazio bat, oro har, “Purua” gisa onartzen da DNArako. Balio hori pixka bat txikiagoa bada, DNArekin batera garbitu diren gatzak edo osagai posibleak egon daitezke.

DNA kuantifikatzeko protokoloa:

- Zuriaren neurketa egin (Erauzketa ostean DNAREN erresuspentsioa egiten den soluzioa, inolako azido nukleikorik gabe. milli-Q ura izan ohi da).
- Laginaren 1  $\mu$ L irakurgailuan utzi burbuilarik egin gabe, horrek kuantifikazio zuzena eragotziko bailuke.
- Irakurlea kontuz itxi eta kuantifikazioari ekin.
- Oihal lehor batekin garbitu eta lehen bi urratsak errepikatu.

- *Genotipatze-analisia*

Genotipatze-analisia EHUko SGiker Genomika Unitatean aztertu da, FLUIDIGM sistemarekin eta 96.96 JUNO™ IFC txipekin (South San Francisco, Estatu Batuak).

Genotipatzeren protokoloa:

Aztertu nahi diren *loci*etan oinarrirituta, SNPtype (Fluidigm®) zunden diseinua eskatu zen. Ondoren, hiru plaka independente jaso ziren, beharrezko SNPtype zunda-multzoarekin:

- *SNPtype STA probes: Specific Target Amplification primers.*
- *SNPtype LSP probatu: Locus-Specific Lehenengoa (reverse).*
- *SNPtype ASP probes: Allele-Specific Primers ASP1/ASP2 (Fwd).*

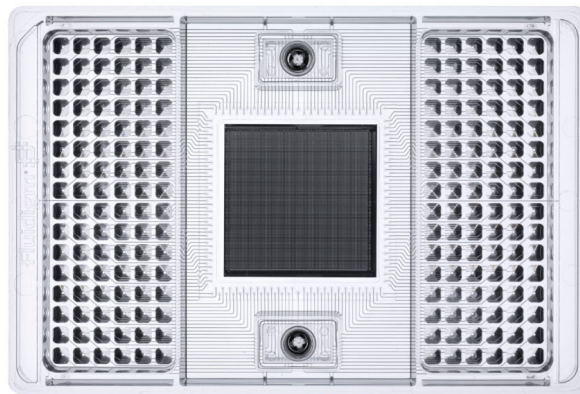
DNA fluorimetria bitartez lortu zen, 2,5–250 ng/uL kontzentrazioetan, kalitate espektrofotometrikoko parametroak balio optimoetan egon daitezzen.

Hurrengo protokoloa erabili zen, 94 lagineko set bakoitzeko + 2 negatiboentzat:

1. STA erreakzioa (*Specific Target Amplification*): STA eta LSP zundekin batera, aztertu beharreko SNP bakoitza duten eskualde genomiko guztiak koanplifikatzen dira, lagin guztiak aldeztatik normalizatzea lortuz. Erreakzio hori Veriti™ Applied Biosystems™ (Waltham, Estatu Batuak) termozikladoretan egiten da, Fluidigmek ezarritako PCR protokoloa erabiliz (1,25 ul DNA + 3.75 ul *sample master mix*).

2. Txipa kargatzea: laginak dagozkien putzuetan pipeteatu ondorean, 96.96 JUNO (Dynamic Array IFC) txipa kargatzen da, kargatze-kontrolagailu baten bidez (IFC - *integrated fluidic circuits - controller*) (**8. irudia**):

- Laginak (5 uL): 2.75 uL aurretiko STA erreakziotik (1/100 diluituak) + 2.25 uL *sample master mix*.
- Assays (4 uL): LSP eta ASP zunden nahasketa, aztertu beharreko SNP bakoitzerako.



**8. irudia.** JUNO 96.96 *Dynamic Array™ IFC for Genotyping*.

3. RT-PCR alelo espezifikoa eta datuak jasotzea: SNP bakoitzerako eta lagin bakoitzerako amplifikazio alelo-espezifikoa egiten da, RT-PCR baten bidez Biomark HD System termoziklatzailean, Fluidigm protokoloari jarraituz. Ondoren, datuak Biomark Data Collection (Fluidigm) softwarearekin lortzen dira (**9. irudia**).



9. irudia. Juno™ IFC controller (ezkerra) eta Biomark HD systems™ (eskuina).

4. SNP genotipatzea (Fluidigm SNP Genotyping Analysis Software, Fluidigm): hasieran 96 SNP genotipatzea programatu zen (**1. taula**).

Azken aukeraketa egiteko, lehenik, literaturaren berrikuspen sistematikoa egin genuen (**1. eranskina**), eta, bigarren, EAEko biztanleria kaukasiarraren SNPen presentzia aztertu zen. Azkenik, Piren garapenarekin lotutako genotipo garrantzitsuenak aztertu ziren (**2. taula**).

SNPen hautaketarako Hardy-Weinbergen orekaren analisisa ere egin zen, Chi-cuadrado testarekin. Populazio ideal batean, non tamaina infinitukoa den, gizabanakoak diploideak, ugalketa sexuala, sexuen arteko desberdintasun alelikorik gabe, eta mutazioen/ migrazioen/ hautaketaren/ deribazioaren ondoriozko asaldurarik ez dagoen, maiztasun alelikoek Hardy-Weinbergen oreka deritzona lortzen dute. Oreka horren pean, espero diren maiztasun genotipikoak frekuentzia alelikoen arabera daude (p eta q):

$$(p + q)^2 = p^2 + 2pq + q^2$$

p eta q sistema bialelikoaren maiztasun alelikoei dagozkie;  $p^2$  eta  $q^2$  genotipo homozigotoen maiztasunak dira; eta  $2pq$  heterozigotoaren maiztasun genotipikoa. Hipotesi nulua onartzen denean ( $p \geq 0,05$ ), populazioa une jakin horretan *locuserako*

Hardy-Weinbergen orekan dagoela zehazten da. Hipotesi nulua errefusatzen denean ( $p < 0,05$ ), biztanleria ez dela espero bezala banatzen ondorioztatzen da, biztanleria horretan gertatzen ari den aldaketaren baten ondorioz.

**1. taula.** Hasierako genotipatzean aztertutako SNPak.

ADRA1: rs1383914, rs1048101
ADRB2: rs1042713
BMP4: rs17563
BRAF: rs10487888
BRINP3: rs1935881
CD14: rs2569190
CHST11: rs835487
COL1A1: rs1800012
COMT: rs4680, rs165599
DROSHA: rs7719666, rs3805500
DRD2: rs6277
ENPP1: rs858339
ESR1: rs2234693, rs1643821
FGF3: rs4631909
FGF10: rs900379
GBP-1: rs7911
GDF5: rs143383
GFR1: rs3781545
HTR2A: rs6311
IL1B: rs16944, rs1143627
IL6: rs1800795
IL10: rs1800896
JAK2: rs2274471
KCNS1: rs734784
LOC107986766: rs2097903
LRP1: rs11172113
LTF: rs1126477, rs17078864, rs12629300, rs17141154, rs1034383, rs6441990, rs6441995, rs7629657, rs9862186
MTHFR: rs1801131, rs2236225
MTRR: rs1801394
OPG: rs2073617
POLR1C: rs699937
PRKCA: rs887797
RANKL: rs9533156
RGS7: rs6689169
RGS13: rs3795617
RXP2: rs1531554
SSTR2: rs7210080
SCN9A: rs12620053, rs4453709, rs7607967, rs13017637
SHMT1: rs1979277
SMAD3: rs12901499
SMC1B: rs3747238
SNAP25: rs3746544
SUFU: rs11594179
TGF1: rs1800469
TNKS1BP: rs11602501
TRPV2: rs395357
TSC1: rs3827665
UPP2: rs7565931

**2. taula.** Hortz-inplanteen osteointegrazioarekin erlazionatutako SNPak.

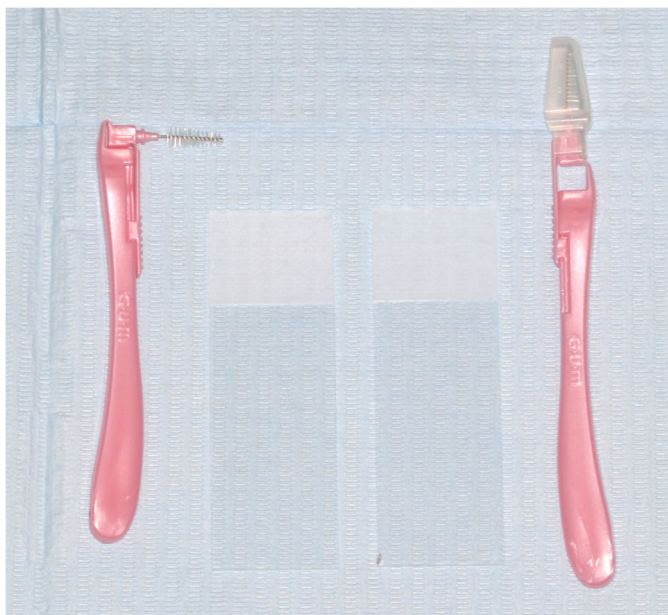
<b>Hantura-erantzunaren proteinak</b>
GBP1: rs7911
IL1 $\beta$ : rs16944
IL6: rs1800795
IL10: rs1800896
<b>Hezur-birmoldaketaren proteinak</b>
BMP4: rs17563
BRINP3: rs1935881
CD14: rs2569190
FGF3: rs4631909
FGF10: rs900379
LTF: rs1126477
OPG: rs2073617
RANKL: rs9533156

### 3.2.2. Analisi zitologikorako lagina

#### 3.2.2.1. Lagin zitologikoa hartzea

Azterketa zitologikoa egiteko, 3 lagin hartu ziren (**10. irudia**). KATean bi lagin zitologiko hartu ziren PIDun inplante batetik (alde distala eta mesiala), eta lagin zitologiko bat osasun periinplantarioan zegoen inplante batetik (PI eta PI gabeko inplanteak izanez gero). PIren lagina HGM maila handieneko inplantetik lortu zen beti. KOTean, lagin zitologikoa osasun periinplantarioan zegoen inplante batetik bat hartu zen.

Lagin zitologikoak mukosa periinplantarioa 10 segundoz karrakatuz hartu ziren, presio arinarekin irristatze eta errotazioa mugimenduak eginez, ehun periinplantarioei kalterik ez egiteko (hiru aldiz). Lagin hartzea angulazio aldakorreko GUM® *Bi-Direction* (Etoy, Suitza) hortzetako mikroeskuila batekin egin zen hotrtz-inplante bakoitzean.



**10. irudia.** Laginak jasotzea. Material zitologikoa erauzteko kita: hortzetako mikroeskuilak eta portaobjetuak.

Lortutako materiala kodetutako Superfrost® Plus (Thermo Scientific™ Waltham, Estatu Batuak) portaobjetuetan zabaldu zen. Hedatuak Kito-Fix Kaltek® (Saonara, Italia)



esprai alkoholiko estandarrekin finkatu, airean lehortu eta portak eramateko kutxa itxietan sartu ziren.

### 3.2.2.2. Lagin zitologikoaren analisia

Lagin zitologikoak EHUko Odontologia Klinika Zerbitzuaren Aho eta Masailezurretako Patologia Unitatearen Laborategian aztertu eta ebaluatu ziren.

- *Tindatzea*

Hedatu zitologiko guztietan Papanicolaou tindaketa egin zen.

Papanicolaou tindaketa frotis zelulak eta gorputzeko jariakinak bereizteko erabiltzen den teknika histologiko multikromatiko klasikoa da. Kolorazio nuklearrerako Harris Hematoxilina erabiltzen da (alkoholiko basofiloa), eta kolorazio zitoplasmatikorako beste bi koloratzaile alkoholiko erabiltzen dira (*Orange G* eta *EA-50*), zelulak koloratzaile bakoitzaren afinitate elektrostatiakoaren eta pisu molekularren arabera modu diferentzian tindatzen dituztenak. *Orange G*-ak hiperkeratosiarekin ondo bereizitako zelula helduen zitoplasmak tindatzen ditu kolore laranja sortuz; eta *EA-50*, eosinaren, argi berdearen eta Bismarck nabarraren arteko nahasketa da. Eosinak azaleko eta tarteko zelulak tindatzen ditu (kolorazio eosinofiloa), argi berdeak gutxien bereizten diren zelula basal eta parabasalak (kolorazio basofiloa), eta Bismarck arreak zelula endozerbikalen muzina (Gill, 2013).

Papanicolaou tindaketa protokoloak hainbat urrats ditu:

- Lagina ondoz ondoko murgildu % 80ko alkoholean, % 70eko alkoholean, % 50eko alkoholean eta uretan, minutu batez likido bakoitzean.
- Lagina Harris Hematoxilinarekin tindatu, 5 minutuz.

- Lagina 6 aldiz murgildu uretan, segundo batez aldi bakoitzean.
- Lagina 8 aldiz murgildu % 0,5 azido klorhidrikoan, segundo batez aldi bakoitzean.
- Lagina ur korrontearekin garbitu 5 minutuz, eta ondoz ondoko murgildu % 50ko alkoholean, % 70eko alkoholean, % 80ko alkoholean eta % 96ko alkoholean, 30 segundoz bakoitzean.
- Lagina Papanicolaou OG6 soluzioarekin tindatu, minutu batez.
- Lagina Papanicolaou OG6 soluzioarekin tindatu, minutu batez.
- Gehiegizko koloratzailea % 96ko etanoleko bi bainutan garbitu, 3-4 segundoz bakoitzean.
- Lagina Papanicolaou EA 50 soluzioarekin tindatu, 2 minutuz.
- Lagina etanol % 96ko 3 ontzitan garbitu, 4 segundoz bakoitzean.
- Lagina etanol absolutuan garbitu, 30 segundoz.
- Lagina isomero eta etanol absolutuko bainu batean sartu (1:1), 4 minutuz.
- Lagina xilenoarekin argitu, 3 minutuz.
- Prestaketa muntatzeko bitartekoa erabiltzea.

### 3.2.3.3. Elementu zitologikoak identifikatzeko protokoloa

- *Balorazio zitologikoaren aldagaiak*

Hedatu zitologikoen balorazioa bi patologok egin zuten EHUko Odontologia Klinika Zerbitzuaren Aho Patologia eta Medikuntza Laborategian, foku-anitzeko Olympus® (Tokio, Japonia) BX51 mikroskopio batekin, behaketa-mailaren araberako igoera aldakorrak erabiliz (4x, 10x, 20x, 40x edo 100x). Identifikazio zitologikoaren protokolo espezifikoak honako datu hauek jasotzen zituen:

- Lortutako material zitologikoaren kantitatea: eza, urria, ugaria.
- Osagaiak. Kantitate balioak: eza, urria, ugaria.

- Zelula epitelial ezkatatsuak: tartekoak (nukleoa duten zelulak) eta azalekoak (nukleorik gabeko zelulak)
- Detritusa
- Mikrobiota. Simplea (kokoak, baziloak), Konplexua (espiroketak, “arto-buru” taldeak)
- Germenek kolonizatutako zelula ezkatatsuak
- Hantura-zelulak: polimorfonuklearrak, linfozitoak, beste batzuk
- Hematiak

Patologo bakoitzak birritan egin zuen osagaien analisisa modu ordenatuan, portaobjetuak mutur batetik bestera behatuz, erlojuaren orratzen noranzkoan. Lehen ebaluazioan 10x gehitu zen, eta, ondoren 20x edo 40x, beharren arabera.

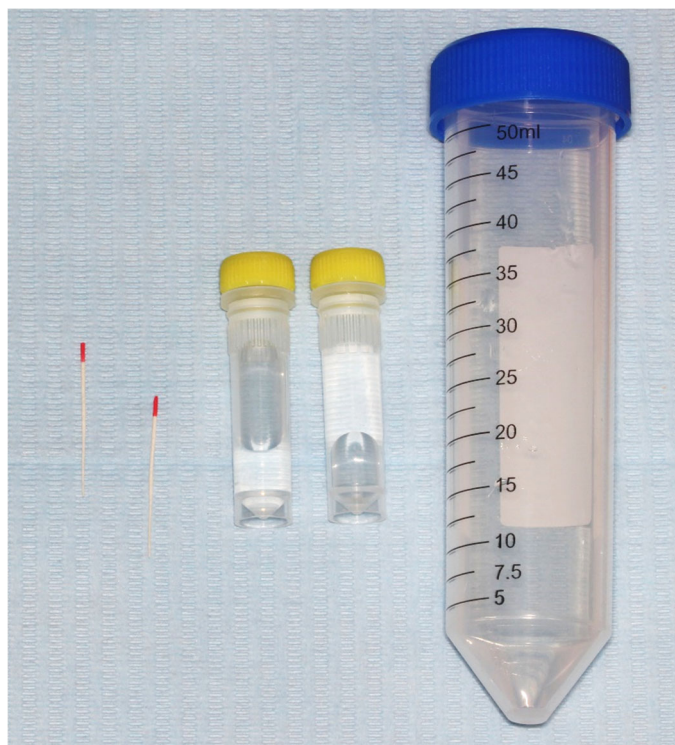
Aldagai bakoitzaren balorazio kuantitatiboa egiteko, hedatu zitologiko bakoitzaren 4 eremu adierazgarri azertu ziren. Eza, urria eta ugaria balioak, Francisco Javier Vallejo Aisa Doktorearen Doktorego tesian ezarritako protokoloa jarraituz ezarri ziren (2017).

### 3.2.3. Analisi mikologikorako lagina

#### 3.2.3.1. Lagin mikologikoa hartzea

Azterketa mikologikorako 2 lagin mota bildu ziren (**11. irudia**):

- Ahoko irakuzketaren lagina, 20 mL milli-Q ur disoluzioarekin, minutu batez. Edukia jaso eta 50 mL-ko Falcon hodi batean isuri zen. Ondoren, -8°C-ko tenperaturan biltegitatu zen.
- Paper-punta esterilen lagina fluido periinplantarioan, 30 segundoz. KOTean PIRik gabeko inplante baten fluido periinplantarioaren eta hortz baten fluido krebikularraren lagin bat hartu zen. KATean PIDun inplante baten (HGM handiagoarekin) eta inplante osasuntsu baten fluido periinplantarioaren lagin bat hartu zen; baita hortz baten fluido krebikularrarena ere. Edukia 2 mL milli-Q ur disoluzioan jaso eta 2,5 mL-ko *eppendorf* hodi batean biltegitatu zen. Ondoren, -8°C-ko tenperaturan biltegitatu zen.



**11. irudia.** Laginak jasotzea. Material mikologikoa erauzteko kita: paper-puntak, *eppendorf* hodiak 2 mL ur milli-Q esterilarekin eta Falcon hodia 20 mL ur milli-Q esterilarekin.

### 3.2.3.2. Lagin mikologikoaren analisia

Laginak EHUko Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Sailaren Mikologia Laborategian aztertu dira, Elena Eraso Irakaslearen zuzendaritzapean.

- *Materiala zentrifugatzea*

Lehenik, irakuzketarekin lortutako bolumena berdindu zen (20 mL). Ondoren, materiala 10 minutuz zentrifugatu zen, irakuzketa lagina 5.000 b/min-ra eta paper-puntena 400 b/min-ra, pellet zelularra berreskuratzeko. Gero, gainjalkina erretiratu zen.

- *Hazkuntza eta isolamendu mikologikoa*

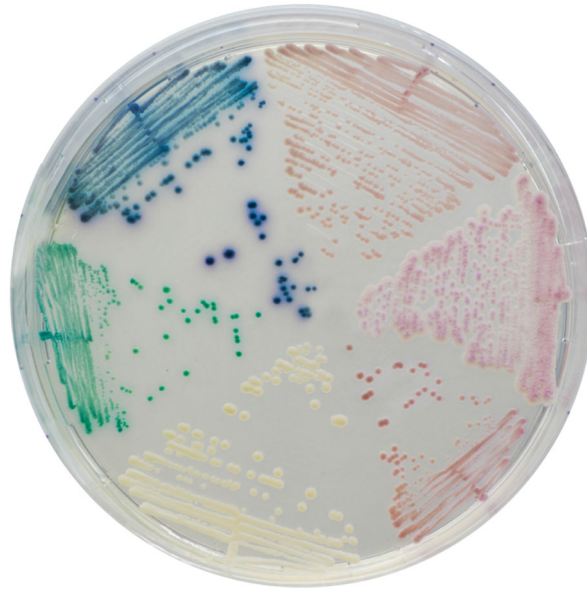
Irakuzketa laginaren (pellet) edukiaren 100 mL eta paper-punten laginen 50 mL bildu ziren, eta *Candida* Chromogenic Agar/CONDA (CondaLab®, Madril, Espainia) bereizitako plaka baten azalera osoan eskuz sakabanatu ziren. Plaka guztiak 36±1 °C-tan inkubatu ziren. Hazkunde mikologikoa 24, 48 eta 72 ordutan ebaluatu zen.

- *Candida spp. identifikatzea*

Lehenik, *Candida spp.*-ren ustezko identifikazioa egin zen, kolonien analisi kuantitatiboa (koloniak eratzen dituzten unitateak/ CFU) eta kualitatiboaren (kolorea, forma eta testura) bidez.

CONDA *Candida* generoko espezie batzuk isolatzeko eta identifikatzeko prestatutako kultibo-ingurune bat da, substratu kromogenoen hidrolisi espezifikoak erabiltiz (galaktosidasa eta beste hexosaminadasak) (**12. irudia**).

*Candida albicans*: berdea; *Candida dubliniensis*: berdea; *Candida glabrata*: bioleta; *Candida guilliermondi*: arrosa-bioleta; *Candida krusei*: arrosa matea; *Candida parapsilosis*: zuria; *Candida tropicalis*: urdina; *Saccharomyces cerevisiae*: bioleta.



**12. irudia.** Garrantzi klinikoko *Candida spp.* espezie nagusien bereizketa kolorimetrikoa. *Candida* Chromogenic Agar/CONDA (GranuCult® Merck KgaA, Darmstadt, Alemania).

Onddo hariztatuak isolatzeko DRBC (Dikloran-Arrosa bengala-Cloranfenicol) (GranuCult® Merck KgaA, Darmstadt, Alemania) agar kultibo-ingurunea erabili zen. Arrosa-Bengala-Cloranfenicol agarrarekin konparatuta, DRBCren pH-a 5,6koa da, diklorana (0,002 g/l) gehitzen zaio eta Arrosa-Bengalako kontzentrazio txikiagoa (0,025 g/l) du. Horren ondorioz, bakterioak eta legamiak gehiago inhibitzen dira. Dikloroa sartzeak onddo mukorazeoak azkar zabaltzea eragozten du eta beste genero batzuetako kolonien tamaina murrizten du, kolonien zenbaketa erraztuz.

Espezieen azken baieztapena API ID 32C (bioMérieux, Marcy L 'Étoile, Frantzia) proba fisiologikoen eta Polimerasaren kate-erreakzioa (PCR) eta agarosa-geleko elektroforesia metodo molekularren bidez lortu zen.

API ID 32C karbono-iturriak asimilatzeeko proba da, eta haren galeria 32 kupulak osatzen dute: 29k karbono-substratu deshidratatu bat dute, bata kontrol negatiboa da, beste batek zikloheximidarekiko sentikortasuna detektatzen du, eta azkena eskulinarentzako kolorimetroko bat da. Substratuak honako hauek dira: sorbitola, d-xilosa, erribosa, glizerola, ramnosa, palatinosa, eritritola, melibiosa, glukoronatoa, melezitosa, glukonatoa, levulinatoa, glukosa, sorbosa, glukosina, zizelkina, galaktosa, akritona, sakarosa, N-azetil-glukosina, DL-laktatoa, Larabinosa, zelobiosa, rafinosa, maltosa, trehalosa, 2-cetol-glukonatoa, alfa-metil-D-glukosidoa, manitola, laktosa eta inositola (Baires-Varguez et al., 2007).

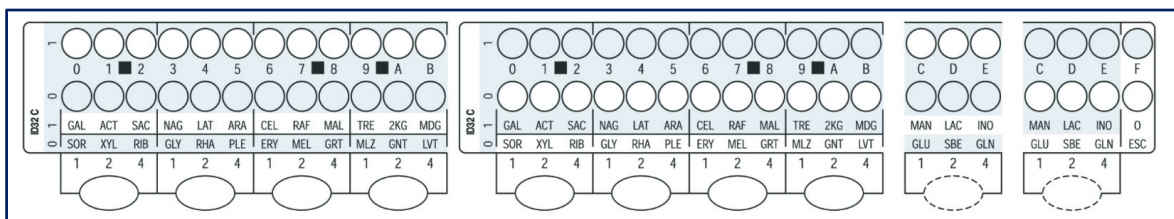
Teknika honek legami itxura duten 63 espezieen identifikazioa ahalbidetzen du: *Candida albicans*, *Candida boidinii*, *Candida catenulata*, *Candida colliculosa*, *Candida dattila*, *Candida dubliniensis*, *Candida famata*, *Candida glabrata*, *Candida globosa*, *Candida guilliermondii*, *Candida hellenica*, *Candida holmii*, *Candida inconspicua/norvegensis*, *Candida intermedia*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lambica*, *Candida lipolytica*, *Candida lusitaniae*, *Candida magnoliae*, *Candida melibiosica*, *Candida membranifaciens*, *Candida norvegica*, *Candida parapsilosis*, *Candida pelliculosa*, *Candida pulcherrima*, *Candida rugosa*, *Candida sake*, *Candida silvicola*, *Candida sphaerica*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida valida*, *Candida zeylanoides*, *Cryptococcus albidus*, *Cryptococcus curvatus*, *Cryptococcus humicola*, *Cryptococcus laurentii*, *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus terreus*, *Cryptococcus uniguttulatus*, *Debaryomyces etchellsii/carsonii*, *Debaryomyces polymorphus*, *Geotrichum capitatum*, *Geotrichum spp*, *Kloeckera apis/apiculata*, *Kloeckera japonica*, *Kodamaea ohmeri*, *Pichia farinosa*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces kluyverii*, *Sporobolomyces salmonicolor*,

*Stephanoascus ciferrii*, *Trichosporon inkin*, *Trichosporon asahii*, *Trichosporon mucoides*, *Williopsis saturnus* *Zygosaccharomyces spp.*

API ID 32C protokoloa:

- Identifikatu beharreko kultibo gazte bat 2 mL ur destilatu esteriletan berresekitu, McFarlandeko 2 ml-ko uhertasuna lortu arte.
- Esekidura horren 250 µL C *Medium*-eko anpoila batera igaro eta homogeneousatu.
- Aurreko esekiduraren 135 µL gehitu substratu desberdinak dituzten erretiluko kupula bakoitzean.
- Erretilua 30+1 °C-tan inkubatu 24-48 orduz.

Irakurketa egiteko, legamien hazkundea ikusten da, 0 kupularekin alderatuta (lekuko negatiboa) (**13. irudia**). Lekukoa baino uherragoa den kupula batek emaitzen orrian idatzi behar den erreakzio positibo bat adierazten du. Azken horretan, testak hiruko taldetan banatuta daude, eta positibotasuna izanez gero, bakoitzari balio desberdina esleitzen zaio: 1 lehenengoarentzat, 2 bigarrenarentzat eta 4 hirugarrenarentzat. Hirukoa batuz gero, zazpi zifrako kopurua lortzen da, zenbakizko profila osatzen duena.



**13. irudia.** API ID32C teknikako emaitzen fitxa.



*Candida africana*, *C. dubliniensis* eta *C. albicans*-en arteko azken diskriminaziorako, PCR bat egin zen (CR-f/CR-r), *hwp1* genearen amplifikazioaren bidez: 700 pb *C. albicans*-entzat, 569 pb *C. dubliniensis*-entzat eta 941 pb *C. africana*-rentzat (Romeo & Criseo, 2008).

qPCR protokoloak hainbat fase ditu:

- Liofilizatutako *primerrak* milli-Q uretan berresekitu, 10-100  $\mu$ M artean, eta erreakzio-nahasketa prestatu: *biomix* (Bioline 2x), milli-Q ura, *CR Reverse* eta *CR Forward*ekin.
- Erreakzio-nahasketa bakoitzeko 20  $\mu$ L sartu PCR hodi bakoitzera. Ondoren, isolatutako kolonia baten zati bat pikatu pipeta baten puntarekin eta punta PCR *ependorfetan* sartu. Hodiak estalki berezi batekin estali eta *ependorfen* tirak termozikladorean sartzen dira.
- % 1,5eko Agarosa-gela egin, DNA amplifikatzen den bitartean. Gela kubeta batean isuri, orrazia gainean duela, gelifikatu arte. Ondoren, gela TBE1x duen kubetan sartu.
- Lagin bakoitzeko 8  $\mu$ L jarri *parafilm* baten gainean, eta 2  $\mu$ L karga-tanpoiarekin nahastu. Ondoren, orrazia kendu eta laginak kargatu.
- Kubeta itxi eta 90 V-ko elektroforesia martxan jarri, 90 minutuz.
- Gela atera eta ChemiDoc™ BioRad (Hercules, Estados Unidos) transiluminadorean ikusi.

### 3.3. Analisi estatistikoa

Lehenik eta behin, aldagai bakarreko deskribapena egin zen. Aldagai kualitatiboak maiztasunekin eta ehunekoekin deskribatu ziren. Aldagai kuantitatiboetarako, normaltasuna aztertu zen Komogorov-Smirnov testarekin, PP plotarekin eta mugaren teorema zentralarekin. Normaltasun-kasua betetzen bazuen, batez bestekoa, desbideratzea eta tartea erabili genituen horiek deskribatzeko. Betetzen ez bazuten, aldagai horiek medianarekin eta 5, 25, 50, 75 eta 95 ehunekoekin deskribatu genituen.

Bi aldaera aztertzeko, aldagai-motak hartu genituen kontuan:

Bi aldagaiak kategorikoak baziren, Chiren testa erabili genuen, eta aldagaiak mendekoak ez baziren, McNemarren testa.

Bi aldagaietako bat kuantitatiboa bazen (banaketa normalarekin) eta aldagai kategorikoak 2 kategoria bazituen, Student-en T erabiliko genuen; aldagai kuantitatiboak banaketa normalik ez bazuen, aldiz, Mann Whitneyren U testa. Aldagai kualitatiboak 3 kategoria edo gehiago bazituen eta aldagai kuantitatiboak banaketa normala bazuen, faktore baten ANOVA testarekin (bariantzak homogeneoak izanez gero) edo Welch-en testarekin (bariantzak homogeneoak ez badira) egin genuen analisi konparatiboa. Aitzitik, aldagai kualitatiboak 3 kategoria edo gehiago bazituen, baina aldagai kuantitatiboak ez bazuen banaketa normal bat jarraitzen, Kruskal-Wallisen testa.

Bi aldagaiak kuantitatiboak (normalak) baziren eta modu independentean jasota bazeuden, Pearsonen korrelazio-testa erabili genuen. Aldagaiak jarraituak (normalak) eta mendekoak baziren, Student-en T testa erabili genuen erlazionatutako laginetarako. Aldagai batek edo biek banaketa normala jarraitzen ez bazuten, Spearmanen korrelazio-

testaren bidez aztertu genuen korrelazioa. Bi aldagaiak mendekoak baziren, Wilcoxon-en Mailen testa egin zen.

Aldagai anitzeko analisirako, erregresio linealeko ereduak edo erregresio logikoko ereduak erabili genituen, mendeko aldagaiaren arabera.

Azkenik, azterketa zitologikoaren emaitzekiko sentikortasuna eta espezifikotasuna kalkulatu ziren, metodo diagnostiko gisa balioztatzeko. Alde batetik, sentikortasunak benetan gaixo gisa diagnostikatutako banako gaixoen proportzioa kuantifikatzen du; eta beste batetik, espezifikotasunak benetan osasuntsu dauden gizabanakoen proportzioa kuantifikatzen du.

Estatistikoki adierazgarritzat jo zen  $p < 0,05$ . Anlisi guztiak IBM® SPSS® v.28 estatistika-programarekin egin ziren.



## 4. EMAITZAK

### 4.1. Pazienteak

#### 4.1.1. Datu orokorrak

Azterketa honetan 161 paziente ikertu ditugu, 91 emakumeri (% 56,50) eta 80 gizoni (% 43,50) zegozkienak. Azterketa egin zen unean, batez besteko adina  $60,90 \pm 10,22$  urtekoa zen (tartea: 31-86ko urte). Emakumeen kopurua handiagoa izan da, bai KATean (n: 43; % 53,80) eta bai KOTean (n: 48; % 59,30) ( $p = 0,580$ ) (**3. taula**).

Adin-banaketa antzekoa izan da ere bai bi azterketa-taldeetan, KATeko pazienteen batez besteko adina  $61,23 \pm 8,92$  urtekoa izanik (tartea: 31-77 urte), eta KOTekoena  $60,70 \pm 11,41$  urtekoa (tartea: 31-86 urte) ( $p = 0,374$ ). Pazienteen batez besteko adina, lehen inplantea jartzeko momentuan,  $54,30 \pm 9,94$  urtekoa izan zen (tartea: 24-85 urte), eta antzekoa izan zen KATean ( $53,78 \pm 9,00$  urte; tartea: 31-74) zein KOTean ( $55,30 \pm 11,62$  urte; tartea: 28-85) ( $p = 0,20$ ). PIa garatu arte igarotako batez besteko denbora  $4,61 \pm 2,50$  urte izan ziren (tartea: < 1-10 urte); beraz, PIa agertu zen unean pazienteen batez besteko adina  $58,60 \pm 8,90$  urte izan zen (tartea: 32-76 urte) (**3. taula**).

Hortz-inplanteak jarri zirenetik egindako jarraipen klinikoaren denbora 1 eta 13 urte artekoa izan da (batez bestekoa:  $6,43 \pm 3,32$  urte); aldi hori handiagoa izanik KATean (batez bestekoa:  $7,45 \pm 3,19$  urte; tartea: 2-13) KOTean baino (batez bestekoa:  $5,41 \pm 3,14$  urte; tartea: 1-13) ( $p < 0,01$ ) (**3. taula**).

Tabako-kontsumoari dagokionez, paziente guztien % 38,50ek (n: 62) ez zuen tabakorik kontsumitzen, eta % 41,60 (n: 67) erretzaile ohiak ziren; horietatik gehienek (% 92,50; n: 62) 10 zigarro baino gehiago erretzen zuten egunean. Azterketaren unean 32 pazienteek (% 19,90) tabakoa kontsumitzen zuten, eta horietatik % 71k (n: 23) 10 zigarro baino

gehiago erretzen zuten egunean. Taldekako azterketan, KATeko banakoen % 27,50ek (n: 22) ez zuten tabakorik kontsumitzen, eta KOTekoen % 49,40k (n: 40) ( $p < 0,05$ ). Egunean 10 zigarro baino gehiagoko erretzaileen kopurua handiagoa zen KATean (n: 17; % 21,40) KOTean baino (n: 6; % 7,40) ( $p < 0,01$ ). Era berean, egunean 10 zigarro baino gehiago kontsumitu zuten erretzaile ohien kopuru handiagoa KATean zegoen (n: 35; 94,60), KOTean baino (n: 27; % 90) ( $p = 0,650$ ) (**3. taula**).

Alkohol-kontsumoari dagokionez, parte-hartzaile guztien % 52,20k (n: 84) adierazi zuten alkohola normalean ez kontsumitzea, eta % 21,10ek (n: 34) 7 unitate baino gehiago edaten zituela adierazi zuten astean. Kopuru hori handiagoa zen KATean (n: 18; 22,50) KOTean baino (n: 16; % 19,80) ( $p = 0,852$ ) (**3. taula**).

Hipertentsio arteriala aurrekari medikorik ohikoena izan zen bi azterketa-taldeetan (n: 47; % 29,20), ondoren hiperkolesterolemia (n: 25; % 15,50), depresioa (n: 13; % 8,10), hipotiroidismoa (n: 12; % 7,50), asma (n: 11; % 6,80), diabetes mellitusa (n: 10; % 6,20) eta gaixotasun kardiobaskularra (n: 10; % 6,20). Ez dugu desberdintasun esanguratsurik antzeman Piren presentziarekin duten loturari dagokionez (**3. taula**).

#### **4.1.2 Ahoko datu klinikoak**

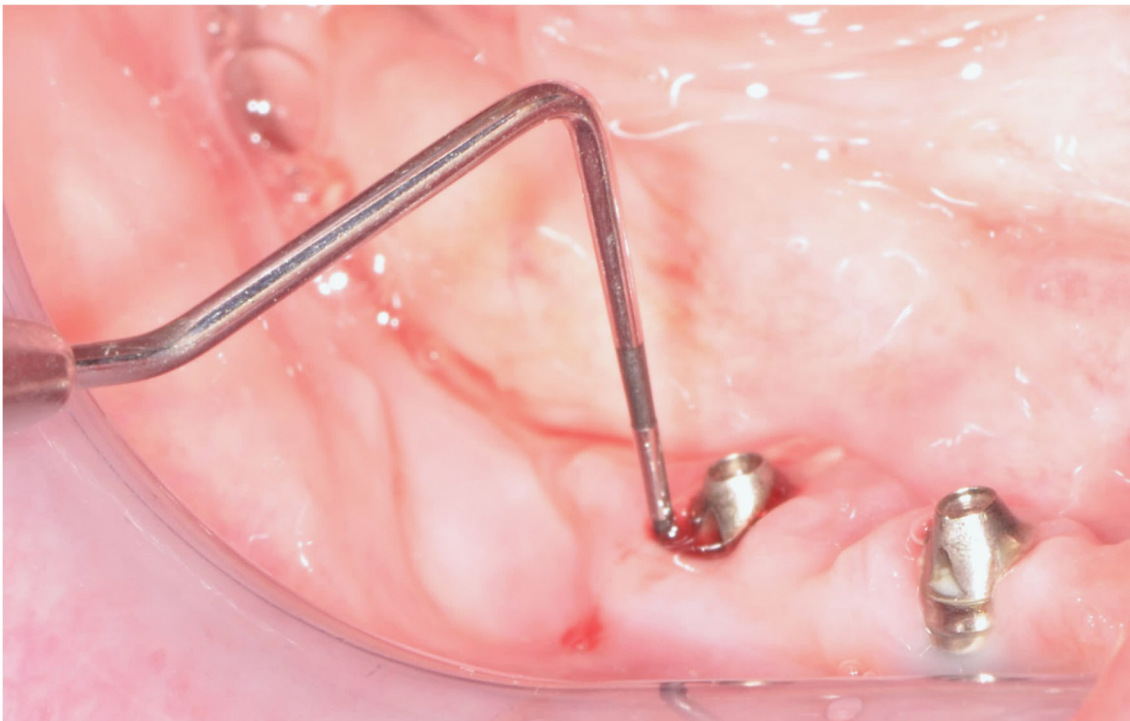
Ikerketan parte hartu zutenen % 39,10ek (n: 63) periodontitis aurrekaria zuen. Zifra hori handiagoa zen KATean (n: 34; % 42,50) KOTean baino (n: 29; % 38,50) ( $p = 0,38$ ) (**3. taula**).

Pazienteen ia erdiek (n: 79; % 49,10) hortz guztiak mantentzen zituzten ahoan, zenbaki hori handiagoa izanik KOTean (n: 44; % 54,30) KATean baino (n: 35; % 43,80). Gainerako parte-hartzaileen % 14,30ek (n: 23) bakarrik edentulismo osoa zuen. Beheko masailezurrean hortzik ez zuten paziente gehiago zeuden (n: 44; % 33,80) goikoan baino (n: 41; % 31,50) (**3. taula**).

Parte-hartzaileek zeramaten errehabilitazio protesikoari dagokionez, % 42k (n: 63) koroak bakarrik zeramatzaten, % 40k (n: 60) zubiak soilik, % 18,70k protesi hibridoak (n: 28), % 6,83k (n: 11) koroak eta zubiak batera, eta % 2,50ek (n: 4) sobredentadurak. Estatistikoki, lotura esanguratsua agertu da zubi motako protesi-eramaileen eta Piren agerpenaren artean (n: 36; % 48) ( $p = 0,046$ ). Azterketaren unean, protesi guztiak torlojututa zeuden (**3. taula**).

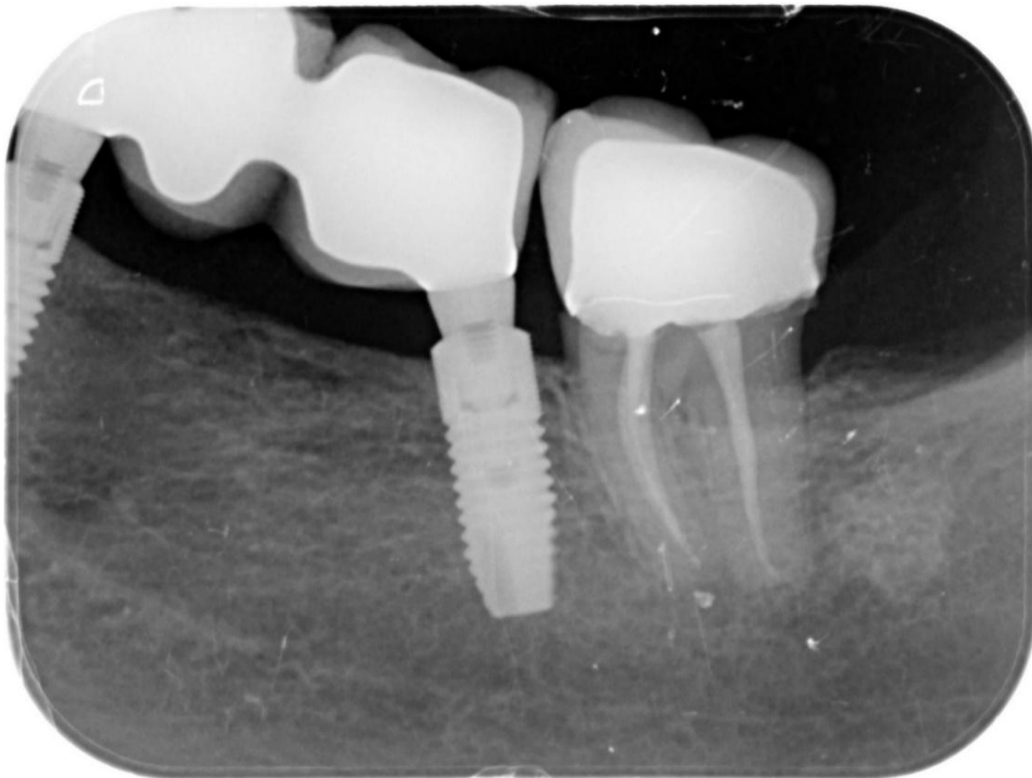
#### 4.1.3. Implanteen datu klinikoak

Ikerketan aztertutako 161 pazienteek 799 implante zituzten guztira, 418 KATean eta 381 KOTean. Partaide bakoitzeko implanteen batez besteko kopurua  $5,23 \pm 3,75$  izan zen KATean (tartea: 1-14) eta  $4,70 \pm 3,22$  KOTean (tartea: 1-14) ( $p = 0,172$ ). Guztira, 229 hortz-implante (% 28,66) PIko diagnostikoa zuten (**4. taula**). KATEko pazienteen % 31,25ek PIa izan zuen azken urtean.



**14. irudia.** Periimplantitisa duen hortz-implante baten itxura klinikoa (4.6 posizioa).

Azterketaren unean, hortz-inplante guztien batez besteko SZ  $3,41 \pm 1,96$  mm-koa zen (tartea: 0-9 mm), batez besteko HGM  $3,99 \pm 2,05$  mm-koa (tartea: 0-10 mm) eta hortz-inplanteen % 20 (n: 160) BOP zuen. Taldekako analisisian, KATeko PIDun hortz-inplanteek  $5,13 \pm 1,25$  mm-ko batez besteko ZS zuten (tartea: 2-9 mm) eta  $5,58 \pm 1,13$  mm-ko batez besteko HZ (tartea: 3-10 mm). Gainera, hortz-inplanteen % 56,30ek (n: 129) eta % 14k (n: 32) BOP eta zornea zuen, hurrenez hurren (**14. irudia**). Bestalde, KOTeko eta PI gabeko KATeko hortz-inplante osasuntsuen batez besteko SZ  $1,72 \pm 1,00$  mm-koa zen (tartea: 0-3 mm), HGM  $2,42 \pm 1,18$  mm-koa (tartea: 0-4 mm), eta % 5,40k (n: 31) BOP aurkeztu zuen mantentze-laneko uneren batean (**15. irudia**). ZSak, HGMak, BOPak eta zundaketarekiko zornearen presentziak lotura estatistikoki esanguratsua erakutsi zuten PIren presentziarekin ( $p < 0,001$ ) (**4. taula**).



**15. irudia.** Osasun periinplantarioa duen hortz-inplante baten erradiografia periapikala (3.6 posizioa).



Hortz-inplanteen % 60,20 (n: 481) beheko masailezurrean zeuden, eta % 39,80 (n: 318) goiko masailezurrean. Banaketa hori antzekoa izan da bi azterketa-taldeetan (**4. taula**) ( $p=0,713$ ). Hortz-inplanteen kokapena ohikoagoa izan da atzeko sektorean (n: 564; % 71,10) aurrekoan baino (n: 229; % 28,90), bai KATean bai KOTean ( $p=0,676$ ) (**4. taula**).

3. taula. Azterketan sartutako pazienteen datu orokorrak eta datu klinikoak.

Datu orokorra	Azterketa taldea			p
	KAT (n: 80)	KOT (n: 81)	Guztira (n: 161)	
Sexua: n (%)				
• Emakumea	43 (53,80)	48 (59,30)	91 (56,50)	0,58
• Gizona	37 (46,30)	33 (40,70)	70 (43,50)	
Adina azterketan (urteak)				
• Batez bestekoa $\pm$ SD	61,23 $\pm$ 8,92	60,70 $\pm$ 11,41	60,90 $\pm$ 10,22	0,37
• Tartea	(37-77)	(31-86)	31-86	
Adina inplantea jartzerakoan (urteak)				
• Batez bestekoa $\pm$ SD	53,78 $\pm$ 9,00	55,30 $\pm$ 11,62	54,30 $\pm$ 9,94	0,20
• Tartea	(31-74)	(28-85)	(28-85)	
Adina PI agertzerakoan PI (urteak)				
• Batez bestekoa $\pm$ SD	-	58,60 $\pm$ 8,90	-	-
• Tartea		(32-76)		
Segimendu denbora (urteak)				
• Batez bestekoa $\pm$ SD	7,45 $\pm$ 3,19	5,41 $\pm$ 3,14	6,43 $\pm$ 3,32	<b>&lt;0,01</b>
• Tartea	(2-13)	(1-13)	(1-13)	
Tabako kontsumoa: n (%)				
• Eza	22 (27,50)	40 (49,40)	62 (38,50)	<b>&lt;0,05</b>
• <10 zig/egun	4 (5)	5 (6,20)	9 (5,60)	
• >10 zig/egun	17 (21,40)	6 (7,40)	23 (14,20)	<b>0,01</b>
• Erretzaile ohia <10 zig/egun	2 (5,40)	3 (10)	5 (7,50)	0,65
• Erretzaile ohia $\geq$ 10 zig/egun	35 (94,60)	27 (90)	62 (92,50)	
Alkohol kontsumoa: n (%)				
• Eza	42 (53,50)	42 (51,90)	84 (52)	0,85
• <7 U/astean	20 (25)	23 (28,40)	43 (26,70)	
• >7 U/astean	18 (22,50)	16 (19,80)	34 (21,10)	
Aurrekari medikoak: n (%)				
• Hipertentsioa arteriala	22 (27,50)	25 (30,90)	47 (29,20)	0,22
• Hiperkolesterolemia	12 (15)	13 (16)	25 (15,50)	0,85
• Depresioa	4 (5)	9 (11,10)	13 (8,10)	2,03
• Hipotiroidismoa	7 (8,80)	5 (6,20)	12 (7,50)	0,39
• Asma	6 (7,50)	6 (6,20)	11 (6,80)	0,11
• Diabetes mellitusa	4 (5)	6 (7,40)	10 (6,20)	0,39
• Gaixotasun kardiobaskularra	4 (5)	6 (7,60)	10 (6,20)	0,33
• Minbizia	4 (5)	5 (6,2)	9 (5,60)	0,10
• Hiato hernia	3 (3,8)	5 (6,2)	8 (5)	0,19
Periodontitis aurrekaria: n (%)				
• Bai	34 (42,50)	29 (35,80)	63 (39,10)	0,38
• Ez	46 (57,50)	52 (64,20)	98 (60,90)	
Edentulismoa: n (%)				
• Osoa	12 (15)	11 (13,60)	23 (14,30)	0,39
• Aurreko sektorea	5 (7,60)	2 (3,10)	7 (5,40)	0,21
• Atzeko sektorea	20 (31,30)	29 (43,90)	49 (37,70)	0,54
• Goiko masailezurra	25 (37,90)	19 (29,70)	44 (33,80)	0,97
• Beheko masailezurra	25 (37,90)	16 (25)	41 (31,50)	0,11
Tratamendu protesikoa: n (%)				
• Koroak	26 (34,70)	37 (49,30)	63 (42)	0,07
• Koroak eta zubiak	6 (7,40)	5 (6,30)	11 (6,80)	0,77
• Zubiak	36 (48)	24 (32)	60 (40)	<b>0,06</b>
• Hibridoa	16 (20)	12 (14,80)	28 (18,70)	0,39
• Sobredentadura	0 (0)	4 (4,90)	4 (2,50)	0,13

4. taula. Azterketan ikertutako hortz-inplanteen datu klinikoak.

Datu klinikoa	Azterketa taldea			p
	KAT (n: 418)	KOT (n: 381)	Guztira (n: 799)	
Inplanteak (n) • Batez bestekoa • Tartea	5,23±3,75 (1-14)	4,70±3,22 (1-14)	4,96±3,49 (1-14)	0,17
Diagnostiko periimplantarioa • Periimplantitisa • Osasun periimplantarioa	229 (54,78) 189 (45,22)	- 381 (100)	229 (28,66) 570 (71,34)	-
Datu klinikoa	Azterketa taldea			p
	KAT PI (n: 229)	PI gabeko KAT eta KOT (n: 570)	Guztira (n: 799)	
ZS (mm) • Batez bestekoa ± SD • Tartea	5,13±1,25 (2-9)	1,72±1,00 (0-3)	3,41±1,96 (0-9)	<0,01
HGM (mm) • Batez bestekoa ± SD • Tartea	5,58±1,13 (3-10)	2,42±1,18 (0-4)	3,99±2,05 (0-10)	<0,01
BOP: n (%) • Bai • Ez	129 (56,30) 100 (43,80)	31 (5,40) 539 (94,60)	160 (20) 639 (80)	<0,01
Zornea: n (%) • Bai • Ez	32 (14) 197 (86)	0 (0) 570 (100)	32 (4) 767 (96)	<0,01
Kokapena: n (%) • Aurreko sektorea • Atzeko sektorea • Goiko masailezurra • Beheko masailezurra	68 (29,70) 161 (70,30) 87 (38) 142 (62)	167 (29,30) 403 (70,70) 221 (38,80) 349 (61,20)	229 (28,90) 564 (71,10) 318 (39,80) 481 (60,20)	0,71 0,68

## 4.2. Azterketa genetikoak

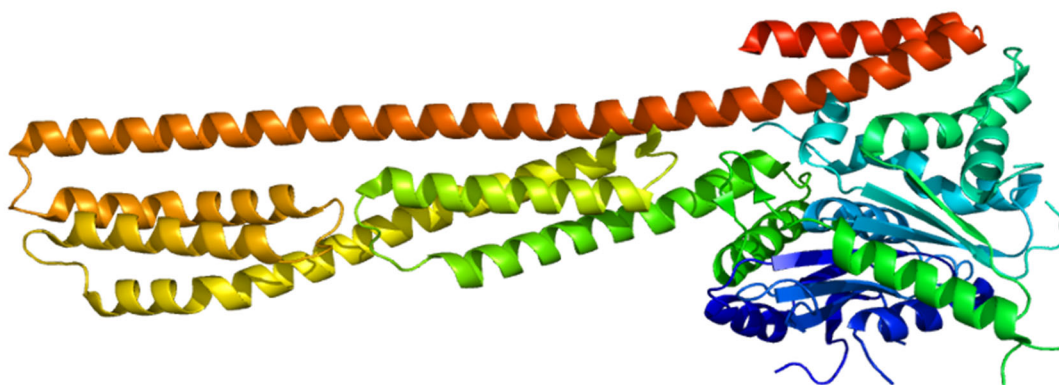
### 4.2.1. Analisi orokorra

Lagin genetikoak 154 parte-hartzailetan aztertu ziren, KATeko 75tan eta KOTeko 79tan, 87 emakumeri eta 66 gizonei zegozkienak,  $60,90 \pm 10,20$  urteko batez besteko adinarekin azterketa egin zen unean.

Hantura-erantzunaren (GBP1: rs7911; IL1 $\beta$ : rs16944; IL6: rs1800795; IL10: rs1800896; TGF, 1: rs1800469) eta hezur-birmoldaketaren (BMP4: rs17563; BRINP3: rs1935881; CD14: rs2569190; FGF3: rs4631909; FGF10: rs900379; LTF: rs1126477; OPG: rs2073617; RANKL: rs9533156) 12 SNP aztertu dira.

KOTaren eta KATaren arteko azterketa konparatiboan, estatistikoki esanguratsua den aldea antzeman da GBP1eko rs7911 polimorfismoan ( $p = 0,04$ ) eta BRINP3ko rs1935881 polimorfismoan ( $p = 0,01$ ) (**16. irudia**) (**5-6 taulak**). Ez dugu bestelako erlazio esanguratsurik ezagutu hantura-erantzunaren edota hezur-birmoldaketaren beste SNPen eta PIren agerpenen artean (**5-6 taulak**).

*Array*ean sartutako gainerako SNPen emaitzak **3. eranskinean** agertzen dira. Ez dugu identifikatu PI diagnostikatutako pazienteekin lotura esanguratsua duen beste SNPrik.



**16. irudia.** GBP1 proteinaren egitura.

**5. taula.** Hantura-erantzunaren proteinen SNPak. Taldekako analisi konparatiboa.

Gen-SNP	Genotipoa	Azterketa taldea: n (%)		p
		KAT	KOT	
GBP1 rs7911	CC	16 (21,6)	12 (15,2)	<b>0,04</b>
	CT	28 (37,9)	46 (58,2)	
	TT	30 (40,5)	21 (26,6)	
IL1 $\beta$ rs16944	AA	7 (9,50)	6 (7,6)	0,80
	AG	37 (50)	37 (46,8)	
	GG	30 (40,5)	36 (45,6)	
IL6 rs1800795	CC	9 (12,3)	6 (7,7)	0,62
	CG	37 (50,7)	43 (55,1)	
	GG	27 (37)	29 (37,2)	
IL10 rs1800896	AA	23 (31,1)	33 (41,8)	0,39
	AG	37 (50)	33 (41,8)	
	GG	14 (18,9)	13 (16,4)	

**6. taula.** Hezur-birmoldaketaren proteinen SNPak. Taldekako analisi konparatiboa.

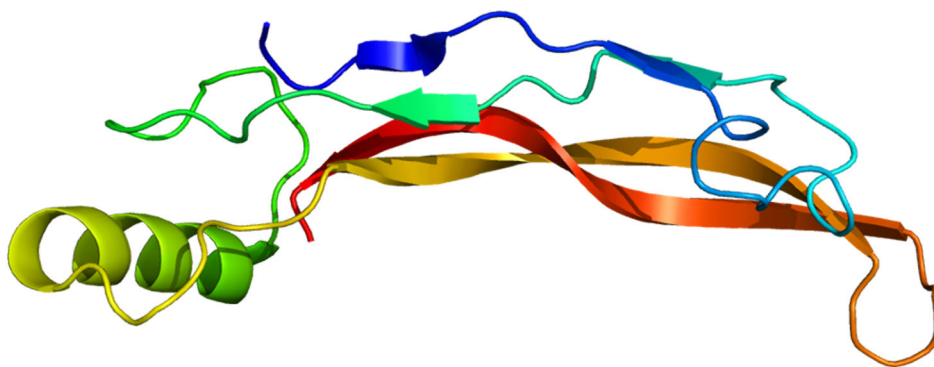
Gen-SNP	Genotipoa	Azterketa taldea: n (%)		p
		KAT	KOT	
BMP4 rs17563	CC	20 (27)	16 (20,3)	0,60
	CT	34 (46)	41 (51,9)	
	TT	20 (27)	22 (27,8)	
BRINP3 rs1935881	AA	41 (55,4)	26 (32,9)	<b>0,01</b>
	AG	25 (33,8)	45 (57)	
	GG	8 (10,8)	8 (10,1)	
CD14 rs2569190	AA	18 (24,3)	16 (20,3)	0,59
	AG	36 (48,7)	45 (57)	
	GG	20 (27)	18 (22,7)	
FGF3 rs4631909	CC	17 (23)	18 (22,8)	0,69
	CT	32 (43,2)	39 (49,4)	
	TT	25 (33,8)	22 (27,8)	
FGF10 rs900379	CC	11 (14,9)	8 (10,1)	0,64
	CT	31 (41,9)	33 (41,8)	
	TT	32 (43,2)	38 (48,1)	
LTF rs1126477	AA	5 (6,8)	3 (3,8)	0,41
	AG	27 (36,5)	23 (29,5)	
	GG	42 (56,7)	52 (66,7)	
OPG rs2073617	CC	11 (14,9)	18 (22,8)	0,46
	CT	36 (48,6)	36 (45,6)	
	TT	27 (36,5)	25 (31,6)	
RANKL rs9533156	CC	12 (16,2)	15 (19)	0,90
	CT	37 (50)	38 (48,1)	
	TT	25 (33,8)	26 (32,9)	

#### 4.2.2. Analisi genetikoa eta arrisku faktoreak

Plren arrisku-faktore aitortuei dagokienez (Schwarz et al., 2018), hantura-erantzunean eta hezur-birmoldaketan inplikaturako 12 SNP aztertu ditugu (GBP1: rs7911; IL1 $\beta$ : rs16944; IL6: rs1800795; IL10: rs1800896; BMP4: rs17563; BRINP3: rs1935881; CD14: rs2569190; FGF3: rs4631909; FGF10: rs900379; LTF: rs1126477; OPG: rs2073617; RANKL: rs9533156).

Estatistikoki esanguratsua den lotura antzeman da KATEko pazienteetan OPGko SNP rs2073617ren eta egunean 10 zigarro baino gehiago erretzen zuten pazienteen artean ( $p=0,03$ ); eta baita BMP4ko SNP 17563ren ( $p = 0,02$ ) eta FGF3ko SNP 189304ren eta diabetes mellitusa zuten pazienteen artean ere ( $p = 0,01$ ) (**17. irudia**) (**7-8. taulak**).

Ez dugu inolako loturarik ezagutu hantura-erantzunean eta hezur-birmoldaketan parte hartzen duten proteinen SNPen eta PIko beste arrisku-faktoreen artean: periodontitisaren aurrekaria (**4. eranskina**).



**17. irudia.** BMP4 proteinaren egitura.

7. taula. Hantura-erantzunaren eta hezur-birmoldaketaren proteinen SNPak. Analisia arrisku-faktoreen arabera: tabako kontsumoa.

Gen-SNP	Genotipoa	KAT			p	KOT			p
		Tabako kontsumoa: n (%)				Tabako kontsumoa: n (%)			
		Ez	<10 zig/eg	≥10 zig/eg		Ez	<10 zig/eg	≥10 zig/eg	
GBP1 rs7911	CC	1 (6,67)	1 (50)	4 (33,33)	0,30	5 (12,82)	0 (0)	2 (33,33)	0,51
	CT	6 (40)	1 (50)	4 (33,33)		21 (53,85)	3 (60)	3 (50)	
	TT	8 (53,33)	0 (0)	4 (33,33)		13 (33,33)	2 (40)	1 (16,67)	
IL1β rs16944	AA	0 (0)	0 (0)	1 (8,33)	0,11	1 (2,56)	1 (20)	0 (0)	0,22
	AG	7 (46,67)	2 (100)	5 (41,67)		19 (48,72)	3 (60)	5 (83,33)	
	GG	8 (53,33)	0 (0)	6 (50)		19 (48,72)	1 (20)	1 (16,67)	
IL6 rs1800795	CC	1 (7,14)	0 (0)	3 (25)	0,46	6 (15,79)	0 (0)	0 (0)	0,45
	CG	8 (57,14)	2 (100)	5 (41,67)		17 (44,74)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	5 (35,72)	0 (0)	4 (33,33)		15 (39,47)	2 (40)	2 (33,33)	
IL10 rs1800896	AA	9 (60)	0 (0)	4 (33,33)	0,37	18 (46,15)	2 (40)	0 (0)	0,06
	AG	5 (33,33)	2 (100)	7 (58,33)		13 (33,33)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	1 (6,67)	0 (0)	1 (8,33)		8 (20,51)	0 (0)	2 (33,33)	
BMP4 rs17563	CC	5 (33,33)	1 (50)	3 (25)	0,41	7 (17,95)	0 (0)	1 (16,67)	0,50
	CT	9 (60)	1 (50)	5 (41,67)		22 (56,41)	2 (40)	3 (50)	
	TT	1 (6,67)	0 (0)	4 (33,33)		10 (25,64)	3 (60)	2 (33,33)	
BRINP3 rs1935881	AA	10 (66,67)	1 (50)	6 (50)	0,89	12 (30,77)	0 (0)	2 (33,33)	0,17
	AG	4 (26,67)	1 (50)	5 (41,67)		22 (56,41)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	1 (6,67)	0 (0)	1 (8,33)		5 (12,82)	2 (40)	0 (0)	
CD14 rs2569190	AA	2 (13,33)	2 (100)	2 (16,67)	0,08	8 (20,51)	0 (0)	2 (33,33)	0,23
	AG	9 (60)	0 (0)	7 (58,33)		23 (58,97)	2 (40)	2 (33,33)	
	GG	4 (26,67)	0 (0)	3 (25)		8 (20,51)	3 (60)	2 (33,33)	
FGF3 rs1893047	AA	6 (40)	1 (50)	2 (16,67)	0,35	10 (25,64)	0 (0)	1 (16,67)	0,35
	AG	7 (46,67)	0 (0)	8 (66,67)		20 (51,28)	3 (60)	2 (33,33)	
	GG	2 (13,33)	1 (50)	2 (16,66)		9 (23,08)	2 (40)	3 (50)	
FGF10 rs900379	CC	3 (20)	1 (50)	1 (8,30)	0,43	1 (2,56)	0 (0)	0 (0)	0,18
	CT	9 (60)	0 (0)	8 (66,70)		7 (17,95)	4 (80)	4 (66,67)	
	TT	3 (20)	1 (50)	3 (25)		31 (79,49)	1 (20)	2 (33,33)	
LTF rs1126477	AA	0 (0)	0 (0)	1 (8,33)	0,15	6 (15,38)	1 (20)	0 (0)	0,34
	AG	4 (26,67)	1 (50)	8 (66,67)		14 (35,9)	3 (60)	4 (66,67)	
	GG	11 (73,33)	1 (50)	3 (25)		19 (48,72)	1 (20)	2 (33,33)	
OPG rs2073617	CC	2 (13,30)	0 (0)	3 (25)	0,03	7 (17,95)	1 (20)	3 (50)	0,43
	CG	7 (46,70)	2 (100)	9 (75)		16 (41,03)	3 (60)	2 (33,33)	
	GG	6 (40)	0 (0)	0 (0)		16 (41,03)	1 (20)	1 (16,67)	
RANKL rs9533156	CC	1 (6,67)	0 (0)	4 (33,33)	0,28	8 (20,51)	1 (20)	1 (16,67)	0,10
	CT	9 (60)	2 (100)	5 (41,67)		18 (46,15)	2 (40)	3 (50)	
	TT	5 (33,33)	0 (0)	3 (25)		13 (33,33)	2 (40)	2 (33,33)	

**8. taula.** Hantura-erantzunaren eta hezur-birmoldaketaren proteinen SNPak. Analisia arrisku-faktoreen arabera: Diabetes mellitus.

Gen-SNP	Genotipo	KAT		p	KOT		p
		Diabetes Mellitus II: n (%)			Diabetes Mellitus II: n (%)		
		Ez	Bai		Ez	Bai	
GBP1 rs7911	CC	10 (18,52)	1 (33,33)	0,81	12 (16,44)	0 (0)	0,22
	CT	19 (35,19)	1 (33,33)		43 (58,9)	3 (50)	
	TT	25 (46,20)	1 (33,33)		18 (24,66)	3 (50)	
IL1 $\beta$ rs16944	AA	6 (11,11)	1 (33,33)	0,22	4 (5,48)	2 (33,33)	0,09
	AG	26 (48,15)	0 (0)		34 (46,58)	3 (50)	
	GG	22 (40,74)	2 (66,67)		35 (47,95)	1 (16,67)	
IL6 rs1800795	CC	8 (15,09)	0 (0)	0,73	6 (8,33)	0 (0)	0,57
	CG	26 (49,06)	2 (66,67)		39 (54,17)	4 (66,67)	
	GG	19 (35,85)	1 (33,33)		27 (37,5)	2 (33,33)	
IL10 rs1800896	AA	18 (33,33)	2 (66,67)	0,47	30 (41,1)	3 (50)	0,90
	AG	29 (53,7)	1 (33,33)		31 (42,47)	2 (33,33)	
	GG	7 (12,97)	0 (0)		12 (16,44)	1 (16,67)	
BMP4 rs17563	CC	13 (24,10)	3 (50)	0,02	15 (20,55)	1 (16,67)	0,73
	CT	28 (51,90)	0 (0)		37 (50,68)	4 (66,67)	
	TT	13 (24)	3 (50)		21 (28,77)	1 (16,67)	
BRINP3 rs1935881	AA	29 (53,70)	2 (66,67)	0,83	23 (31,51)	3 (50)	0,40
	AG	20 (37,04)	1 (33,33)		42 (57,53)	3 (50)	
	GG	5 (9,26)	0 (0)		8 (10,96)	0 (0)	
CD14 rs2569190	AA	13 (24,07)	1 (33,33)	0,57	15 (20,55)	1 (16,67)	0,88
	AG	26 (48,15)	2 (66,67)		41 (56,16)	4 (66,67)	
	GG	15 (27,78)	0 (0)		17 (23,29)	1 (16,67)	
FGF3 rs1893047	AA	14 (25,90)	0 (0)	0,01	13 (17,81)	2 (33,33)	0,60
	AG	28 (51,90)	0 (0)		38 (52,05)	2 (33,33)	
	GG	12 (22,20)	3 (100)		22 (30,14)	2 (33,33)	
FGF10 rs900379	CC	11 (20,40)	0 (0)	0,56	8 (10,96)	0 (0)	0,40
	CT	21 (38,90)	2 (66,70)		31 (42,47)	2 (33,33)	
	TT	22 (40,70)	1 (33,33)		34 (46,58)	4 (66,67)	
LTF rs1126477	AA	5 (9,26)	0 (0)	0,48	16 (21,92)	2 (33,33)	0,77
	AG	18 (33,33)	2 (66,67)		34 (46,58)	2 (33,33)	
	GG	31 (57,41)	1 (33,33)		23 (31,51)	2 (33,33)	
OPG rs2073617	CC	8 (14,81)	1 (33,33)	0,38	15 (20,55)	0 (0)	0,11
	CT	26 (48,15)	2 (66,67)		33 (45,21)	5 (83,33)	
	TT	20 (37,04)	0 (0)		25 (34,25)	1 (16,67)	
RANKL rs9533156	CC	7 (12,96)	0 (0)	0,76	2 (2,78)	1 (16,67)	0,06
	CT	27 (50)	2 (66,67)		23 (31,94)	0 (0)	
	TT	20 (37,04)	1 (33,33)		47 (65,28)	5 (83,33)	



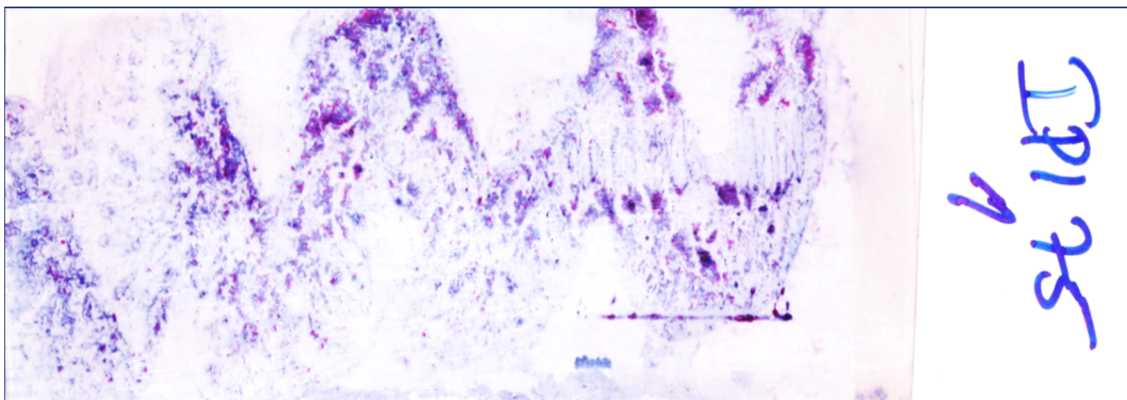
### 4.3. Azterketa zitologikoa

#### 4.3.1. Analisi orokorra

Guztira, 223 hedatu zitologiko aztertu ditugu, 81 KOTekoak eta 142 KATekoak. KATean, 80 hedatu PIDun hortz-inplanteen ehun periinplantarioetatik jaso ziren, eta 62 PIrik gabeko inplanteetatik.

##### 4.3.1.1. Material kantitatea

Egindako hedatu guztiek material zitologikoa zuten. Karrakatzearen ondorioz lortutako material kantitatea ugaria izan da kasu gehienetan, bai analisi orokorrean (n: 141; % 63,20), bai azpitaldeen araberako analisisian (PIDun KAT n: 58, % 72,50; PIrik gabeko KAT n: 34, % 54,80; KOT n: 49, % 60,50) (**18. irudia**) (**9. taula**).



**18. irudia.** Periinplantitis kasu baten hedatu zitologikoa, material kantitate ugarekin (Papanicolaou).

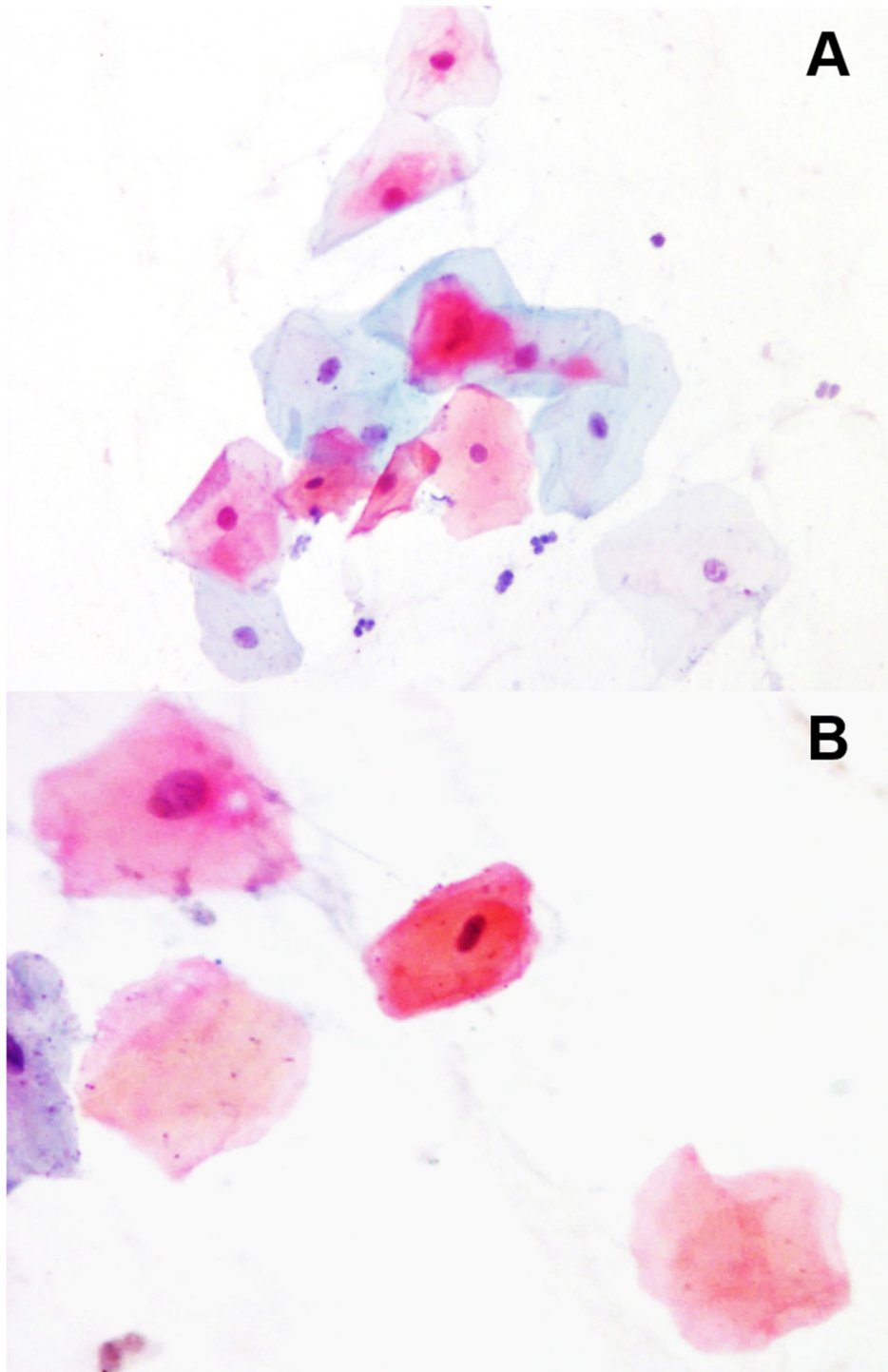
##### 4.3.1.2. Zelula epitelial ezkatatsuak

Zelula epitelial ezkatatsuak bi taldetan banatu ditugu: tartekoak (nukleoa duten zelulak) eta azalekoak (nukleorik gabeko zelulak). Zelula basalekin edo parabasalekin bateragarriak diren zelularik ez dugu ikusi.

Nukleoa zuten zelula epitelialak 221 hedatu zitologikotan identifikatu ditugu ( % 99,10), 122tan ( % 54,70) ugaria izanik. Taldekako analisisian, PIDun KATeko hedatu gehienek zelula epitelial nukleatu ugari zituzten (n: 72; % 90); KOTekoek (n: 57; % 70,40) eta PIrik gabeko KATekoek (n: 34; % 54,80), berriz, zelula urri (**9. taula**) (**19. irudia**).

Hedatu zitologikoek nukleorik gabeko zelula epitelialak izan dituzte kasu gehienetan ere bai (n: 205; % 91); kantitatea, oro har, urria izanik (n: 138; % 61,90). PIDun KATeko hedatuetan kantitatea ugaria zen (n: 44; % 55); eta KOTekoetan (n: 58; % 71,60) eta PIrik gabeko KATekoetan (n: 46; % 74,20) urriagoa (**9. taula**) (**19. irudia**).

PIDun KATeko hortz-inplanteen hedatu zitologikoek nukleo ( $p < 0,01$ ) eta nukleorik gabeko ( $p < 0,01$ ) zelula epitelial ezkatatsu gehiago erakutsi zuten (**9. taula**).

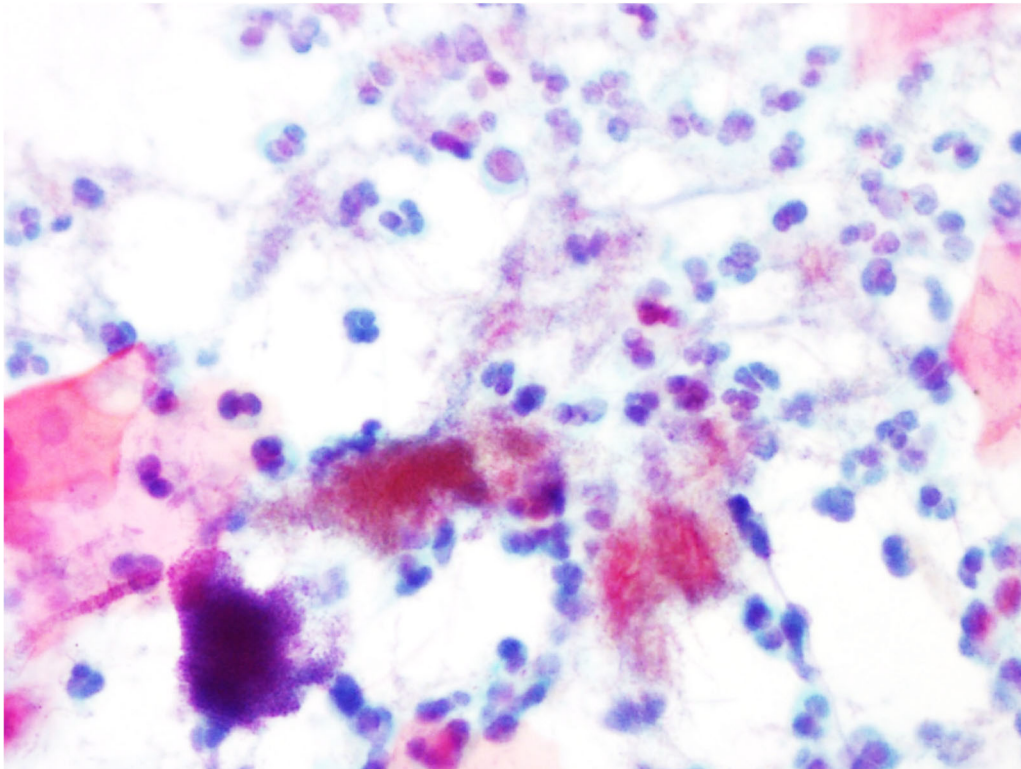


**19. irudia.** Hedatu zitologikoa. **A)** Tarteko zelula epitelial ezkatatsuak nukleoarekin (laranjak eta urdin-berdeak). **B)** Azaleko nukleorik gabeko zelula epitelial ezkatatsuak (laranjak eta arrosak) (Papanicolaou 10x).

#### 4.3.1.2. Detritusa

Aho-elementuen deskonposiziotik eta aglomeratutik datozen detritu-material solidoen presentzia hedatuetan gehien identifikatutako bigarren elementu zitologikoa izan da (n: 205; % 92,80), kasu askotan ugaria izanik (n: 105; % 47,10).

PI dun KATeko lagin gehienek detritu ugari aurkeztu zituzten (n: 55; % 68,80); KOTekoek (n: 44; % 54,30) eta PIrik gabeko KATekoek (n: 33; % 53,20) ez bezala, non kantitatea urria zen. PI dun KATeko hedatuen detritu alde ugaria, estatistikoki esanguratsua izan zen ( $p < 0,01$ ) (**20. irudia**) (**9. taula**).



**20. irudia.** Hedatu zitologikoa. Detritu-material solidoa (morea eta gorria), zelula epitelial ezkatatsuak (laranjak) eta hantura-zelulak (urdinak) (Papanicolaou 10x).

### 4.3.1.3. Mikrobiota

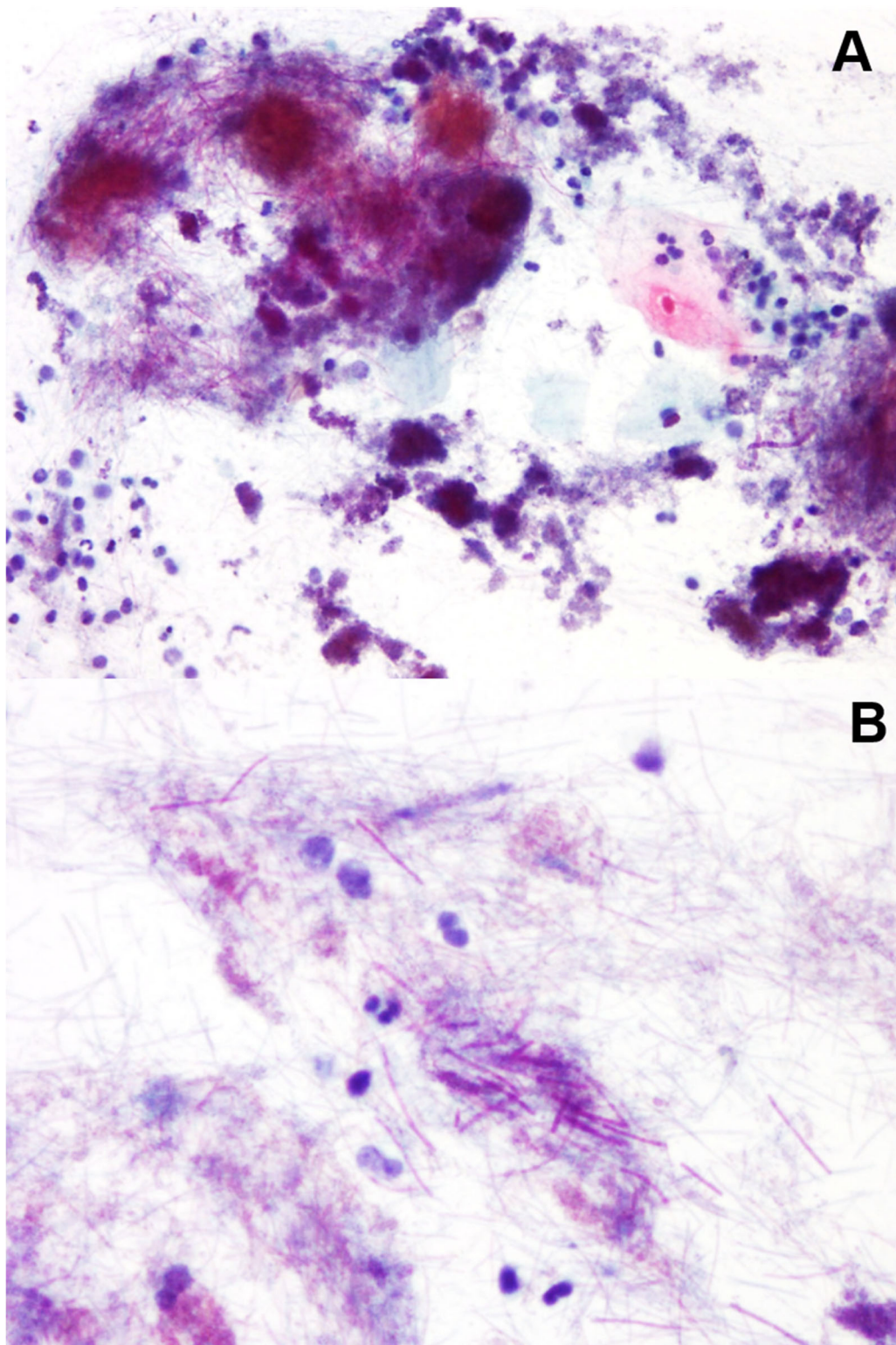
Zitologia-hedatuena % 88,30ean (n: 197) koko eta bazilo itxurako metaketa mikrobianoa ikusi dugu, gehienetan (n: 115; % 51,60) ugaria izanik. PIDun KATeko laginetan mikrobio-kantitatea ugaria zen (n: 54; % 67,50), eta KOTekoetan (n: 31; % 38,30) eta PI gabeko KATekoetan (n: 31; % 50), ostera, urria (**21. irudia**) (**9. taula**).

PIa zuten kasuen zitologia-hedatu periinplantarioek mikrobiota-kopuru (kokoak eta baziloak) handiagoa erakutsi zuten, beste azpitaldeekin konparatuta ( $p < 0,01$ ) (**9. taula**).

Hainbat hedatu zitologikotan, beste mikrobio-formazio konplexuak identifikatu dira, “arto-buru” itxurakoak gehienbat, ohikoagoak eta ugariagoak izan direnak PIDun KATeko kasuetan (n: 33; % 11,30) ( $p = < 0,01$ ) (**21. irudia**) (**9. taula**).

Mikrobioek kolonizatutako epitelio-zelulak hedatu zitologikoen % 79,80an (n: 178) antzeman ditugu, 91 laginetan ugaria izanik (% 40,80). PIko 47 kasutan kantitatea ugaria izan zen (% 58,70), eta KOTeko (n: 35; % 43,20) eta PIrik gabeko KATen gehiengoan (n: 27; % 43,50), aldiz, urria. PIa zuten hedatu-zitologiko periinplantarioek mikrobioek kolonizatutako zelula epitelial gehiago zituzten ( $p < 0,01$ ) (**9. taula**).



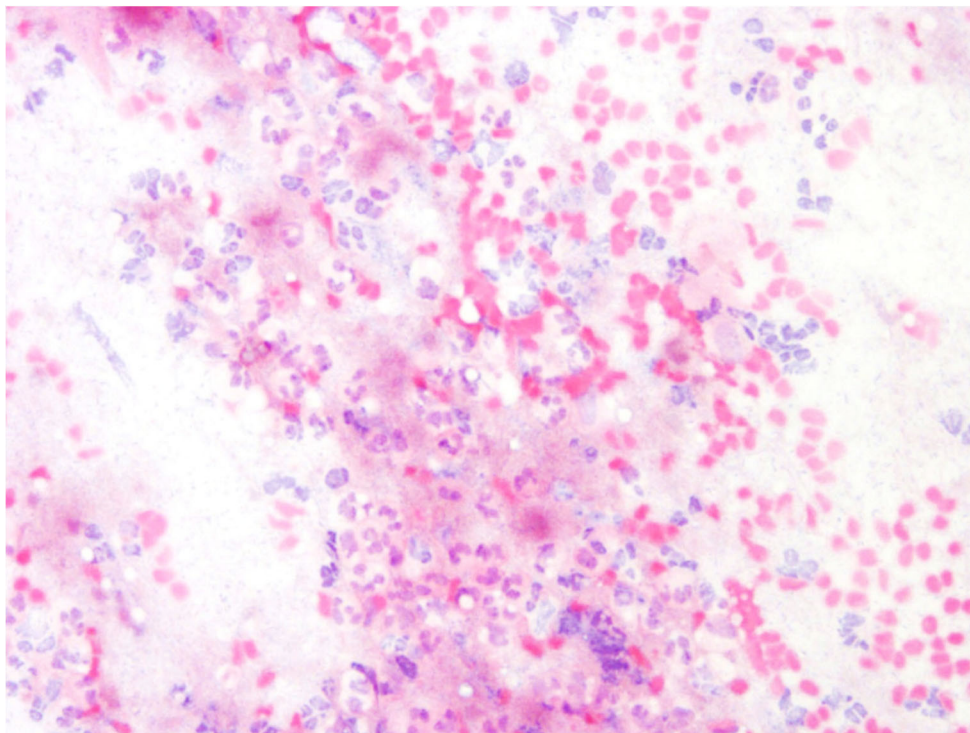


**21. irudia.** Hedatu zitologikoa. **A)** Mikrobioen kolonizazioa: kokoak eta baziloak (morea) hantura-zelulak (urdinak), zelula epitelial ezkatatsuak (arrosa) eta detritusa (gorri-laranja) (Papanicolaou 4x). **B)** Mikrobioen kolonizazioaren zehaztasuna: kokoak, baziloak eta “arto-buru” taldeak (morea), detritusa (gorri-laranja) eta hantura-zelulak (urdina) (Papanicolaou 10x).

#### 4.3.1.4. Hematiak

Hematien presentzia 40 zitologia-hedatuetan baino ez dugu ikusi (% 17,90). PIDun KATeko kasuetan, globulu gorri ugari agertu ziren (% 17,50); eta KOTekoetan (% 6,20) eta PIrik gabeko KATekoetan (% 3,2), berriz, globulu gorri urriak (**22. irudia**).

PIa zuten laginen hedatu zitologiko periinplantarioek globulu gorri gehiago izan zituzten ( $p = 0,01$ ) (**9. taula**).



**22. irudia.** Hedatu zitologikoa. Hematiak (gorriak) eta hantura-zelula akutu polimorfonuklearrak (urdinak eta arrosak) (Papanicolaou 4x).

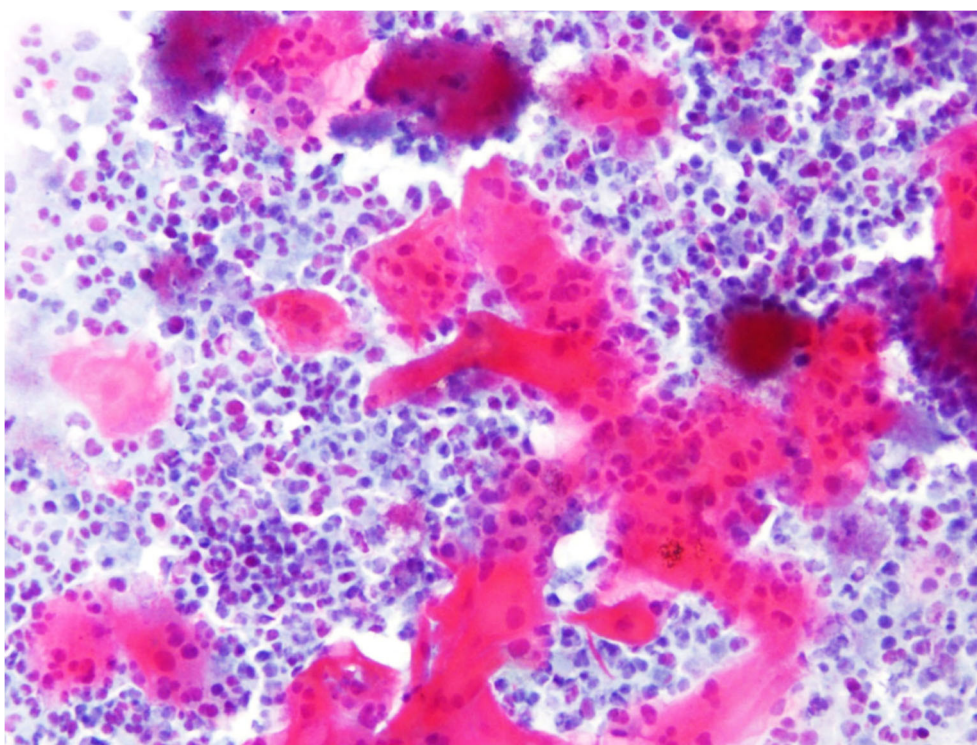
#### 4.3.1.5. Hantura-zelulak

Aztertutako hedatu zitologiko gehienetan hantura-zelula akutuak eta kronikoak identifikatu dira (n: 192; % 86,10); ohikoagoa PIDunetan izanik (n: 73; % 91,30), KOTekoekin (n: 67; % 82,70) eta KATekoekin (n: 45; % 72,60) alderatuta (**22-23. irudiak**) (**9. taula**).



PI dun KAT kasuen hedatu zitologikoetan, PMN kopurua ugaria izan zen (n: 41; % 51,30), eta linfzitoena, berriz, urria (n: 41; % 51,30). KOTeko kasuen hedatu zitologikoetan, linfzitoen kopurua urria izan zen (n: 35; % 43,20), eta PMNrena baino handiagoa (n: 26; % 32,10). Era berean, PIrik gabeko KAT kasuen hedatu zitologikoetan, linfzitoen kopurua urria zen (n: 27; % 43,50), eta PMNrena baino handiagoa (n: 15; % 24,20) (**22-23. irudiak**) (**9. taula**).

PI kasuek PMN kantitate handiagoa zuten, beste azpitaldeak baino ( $p < 0,01$ ) (**9. taula**).



**23. irudia.** Hedatu zitologikoa. Hantura-zelula akutu polimorfonuklearrak (urdinak eta arrosak) eta kronikoak linfzitoak (urdinak), detritusa (gorria) eta zelula epitelial ezkatatsuak (arrosak eta laranjak) (Papanicolaou 10x).



9. taula. Aldagai zitologikoak. Taldekako analisi konparatiboa.

Azterketa taldea	Aldagai zitologikoa. Presentzia: n (%)			p
	Eza	Urria	Ugaria	
	<b>Material kantitatea</b>			
KOT	0 (0)	32 (39,50)	49 (60,50)	0,08
Plirik gabeko KAT	0 (0)	28 (45,20)	34 (54,80)	
Plidun KAT	0 (0)	22 (27,50)	58 (72,50)	
	<b>Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin</b>			
KOT	0 (0)	57 (70,40)	24 (29,60)	<0,01
Plirik gabeko KAT	2 (3,20)	34 (54,80)	26 (41,90)	
Plidun KAT	0 (0)	8 (10)	72 (90)	
	<b>Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleorik gabe</b>			
KOT	6 (7,4)	58 (71,60)	17 (21)	<0,01
Plirik gabeko KAT	10 (16,10)	46 (74,20)	6 (9,7)	
Plidun KAT	2 (2,50)	34 (42,50)	44 (55)	
	<b>Detritusa</b>			
KOT	10 (12,30)	44 (54,30)	27 (33,30)	<0,01
Plirik gabeko KAT	6 (9,70)	33 (53,20)	23 (37,10)	
Plidun KAT	2 (2,50)	23 (28,80)	55 (68,80)	
	<b>Mikrobiota sinplea: Kokoak/ baziloak</b>			
KOT	9 (11,10)	31 (38,30)	41 (50,60)	<0,01
Plirik gabeko KAT	11 (17,70)	31 (50)	20 (32,30)	
Plidun KAT	6 (7,50)	20 (25)	54 (67,50)	
	<b>Mikrobiota konplexua</b>			
KOT	81 (100)	0 (0)	0 (0)	<0,01
Plirik gabeko KAT	57 (91,90)	5 (8,10)	0 (0)	
Plidun KAT	47 (58,80)	24 (30)	9 (11,30)	
	<b>Mikrobiota: Kolonizatutako zelula epitelialak</b>			
KOT	22 (27,20)	35 (43,20)	24 (29,60)	<0,01
Plirik gabeko KAT	15 (24,20)	27 (43,50)	20 (32,30)	
Plidun KAT	8 (10)	25 (31,30)	47 (58,70)	
	<b>Hematiak</b>			
KOT	72 (88,90)	5 (6,20)	4 (4,90)	0,01
Plirik gabeko KAT	55 (88,70)	2 (3,20)	5 (8,10)	
Plidun KAT	56 (70)	10 (12,50)	14 (17,50)	
	<b>Hantura-zelulak: Polimorfonuklearrak</b>			
KOT	35 (43,20)	26 (32,10)	20 (24,70)	<0,01
Plirik gabeko KAT	34 (54,80)	15 (24,20)	13 (21)	
Plidun KAT	10 (12,50)	29 (36,30)	41 (51,30)	
	<b>Hantura-zelulak: Linfozitoak</b>			
KOT	15 (18,50)	35 (43,20)	31 (38,30)	0,15
Plirik gabeko KAT	19 (30,60)	27 (43,50)	16 (25,80)	
Plidun KAT	21 (26,30)	41 (51,30)	18 (22,50)	

### 4.3.2. Analisi zitologikoa eta datu klinikoak

Ez dugu inolako loturarik ikusi pazienteen datu orokorren (generoa, adina, tabako-kontsumoa, alkohol-kontsumoa, aurrekari medikoak) eta aztertutako aldagai zitologikoen artean.

Datu klinikoei dagokienez, erlazio esanguratsua aurkitu dugu, PI diagnostikatutako kasuetan, mikrobio konplexuen presentziaren eta  $\geq 5$  mm-ko ZSren ( $p = 0,05$ ) eta  $\geq 5$  mm-ko HGMren ( $p = 0,008$ ) artean (**10-11 taulak**).

10. taula. Aldagai zitologikoak. KATeko Pldun analisia eta datu klinikoak: ZS.

Datu periodontala		Aldagai zitologikoa. Presentzia: n (%)			p
		Eza	Urria	Ugaria	
<b>Material kantitatea</b>					
ZS	< 5 mm	7 (30,40)	12 (52,20)	4 (17,40)	0,77
	≥ 5 mm	15 (26,30)	28 (49,10)	14 (24,60)	
<b>Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin</b>					
ZS	< 5 mm	0 (0)	10 (43,40)	13 (56,60)	0,48
	≥ 5 mm	0 (0)	26 (43,90)	32 (56,10)	
<b>Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleorik gabe</b>					
ZS	< 5 mm	0 (0)	22 (95,60)	1 (4,40)	0,65
	≥ 5 mm	2 (3,50)	53 (93)	2 (3,50)	
<b>Detritusa</b>					
ZS	< 5 mm	0 (0)	21 (91,30)	2 (8,70)	0,29
	≥ 5 mm	2 (3,50)	44 (77,20)	11 (19,30)	
<b>Mikrobiota simplea: Kokoak/ baziloak</b>					
ZS	< 5 mm	1 (4,30)	14 (60,90)	8 (34,80)	0,60
	≥ 5 mm	5 (8,80)	35 (61,60)	17 (29,60)	
<b>Mikrobiota konplexua</b>					
ZS	< 5 mm	12 (52,20)	9 (39,10)	2 (8,70)	<b>0,05</b>
	≥ 5 mm	35 (61,40)	15 (26,30)	7 (12,30)	
<b>Mikrobiota: Kolonizatutako zelula epitelialak</b>					
ZS	< 5 mm	0 (0)	22 (95,70)	1 (4,30)	0,06
	≥ 5 mm	8 (14)	44 (77,20)	5 (8,80)	
<b>Hematiak</b>					
ZS	< 5 mm	18 (78,30)	3 (13)	2 (8,70)	0,71
	≥ 5 mm	38 (66,70)	10 (17,50)	9 (15,80)	
<b>Hantura-zelulak: Polimorfonuklearrak</b>					
ZS	< 5 mm	4 (17,40)	14 (60,90)	5 (21,70)	0,88
	≥ 5 mm	6 (10,50)	37 (64,90)	14 (24,60)	
<b>Hantura-zelulak: Linfozitoak</b>					
ZS	< 5 mm	3 (13)	20 (87)	0 (0)	0,15
	≥ 5 mm	18 (31,60)	38 (66,70)	1 (1,70)	

11. taula. Aldagai zitologikoak. KATeko Pldun analisia eta inplanteen datu klinikoak: HGM.

Datu periodontala		Aldagai zitologikoa. Presentzia: n (%)			p
		Eza	Urria	Ugaria	
<b>Material kantitatea</b>					
HGM	< 5 mm	2 (16,70)	8 (66,70)	2 (16,70)	0,44
	≥ 5 mm	20 (29,40)	32 (47,10)	16 (23,50)	
<b>Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin</b>					
HGM	< 5 mm	0 (0)	6 (50)	6 (50)	0,73
	≥ 5 mm	0 (0)	29 (42,60)	39 (57,40)	
<b>Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleorik gabe</b>					
HGM	< 5 mm	1 (8,30)	11 (91,70)	0 (0)	0,43
	≥ 5 mm	1 (1,50)	64 (94,10)	3 (4,40)	
<b>Detritus</b>					
HGM	< 5 mm	0 (0)	12 (100)	0 (0)	0,14
	≥ 5 mm	2 (2,90)	54 (77,90)	13 (19,10)	
<b>Mikrobiota sinplea: Kokoak / baziloak</b>					
HGM	< 5 mm	1 (8,30)	6 (50)	5 (41,70)	0,82
	≥ 5 mm	5 (7,40)	43 (63,30)	20 (29,40)	
<b>Mikrobiota konplexua</b>					
HGM	< 5 mm	4 (33,33)	8 (66,70)	0 (0)	<b>0,01</b>
	≥ 5 mm	43 (63,20)	16 (23,50)	9 (13,20)	
<b>Mikrobiota: Kolonizatutako zelula epitelialak</b>					
HGM	< 5 mm	1 (8,30)	9 (75)	2 (16,70)	0,69
	≥ 5 mm	7 (10,30)	57 (83,90)	4 (5,90)	
<b>Hematiak</b>					
HGM	< 5 mm	10 (83,30)	1 (8,30)	1 (8,30)	0,60
	≥ 5 mm	46 (67,60)	12 (17,60)	10 (14,70)	
<b>Hantura-zelulak: Polimorfonuklearrak</b>					
HGM	< 5 mm	3 (25)	8 (66,70)	1 (8,30)	0,34
	≥ 5 mm	7 (10,30)	43 (63,20)	18 (26,50)	
<b>Hantura-zelulak: Linfuzitoak</b>					
HGM	< 5 mm	5 (41,70)	7 (58,30)	0 (0)	0,21
	≥ 5 mm	16 (23,50)	51 (75)	1 (1,50)	

### 4.3.3. Sentikortasunaren eta espezifikotasunaren analisisia

Karrakatze bidezko zitologia esfoliatiboko teknikaren sentikortasun- eta espezifikotasun-tasak, PI metodo diagnostiko gisa, **12. taulan** agertzen dira.

Sentikortasun, espezifikotasun eta AUC maila handieneko aldagai zitologikoak zelula epitelial nukleatuak (Sentikortasuna: % 73,5; Espezifikotasuna: % 81,9; AUC: 74), zelula epitelial anukleatuak (Sentikortasuna: % 88; Espezifikotasuna: % 60,9; AUC: % 72,7) eta hantura-zelulak PMNak (Sentikortasuna: % 71,4; Espezifikotasuna: % 77,3; AUC: % 71,2) izan ziren.

Aztertutako parametro zitologiko nagusien batez besteko sentikortasuna % 77,63koa izan zen, eta espezifikotasuna % 73,33koa.

**12. taula.** Aldagai zitologikoak. Sentikortasun eta espezifikotasunaren analisia.

<b>Aldagai zitologikoa</b>	<b>Sentikortasuna (%)</b>	<b>Espezifikotasuna (%)</b>	<b>AUC (%)</b>
Detritusa	70,5	60,9	65,8
Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin	73,5	81,8	74
Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleorik gabe	88	60,9	72,7
Mikrobiota sinplea	73	61,8	67,6
Mikrobiota konplexua	86,8	54,8	55,6
Mikrobiota: kolonizatutako zelula epitelialak	70,1	56	63,2
Hantura-zelulak: Polimorfonuklearrak	71,4	77,3	71,2
Hantura zelulak: Linfozitoak	57,8	47,5	52,2
Hematiak	77,4	49,5	59,4

## 4.4. Azterketa mikologikoa

### 4.4.1. Analisi orokorra

#### 4.4.1.1. Ahoko irakuzketaren lagina

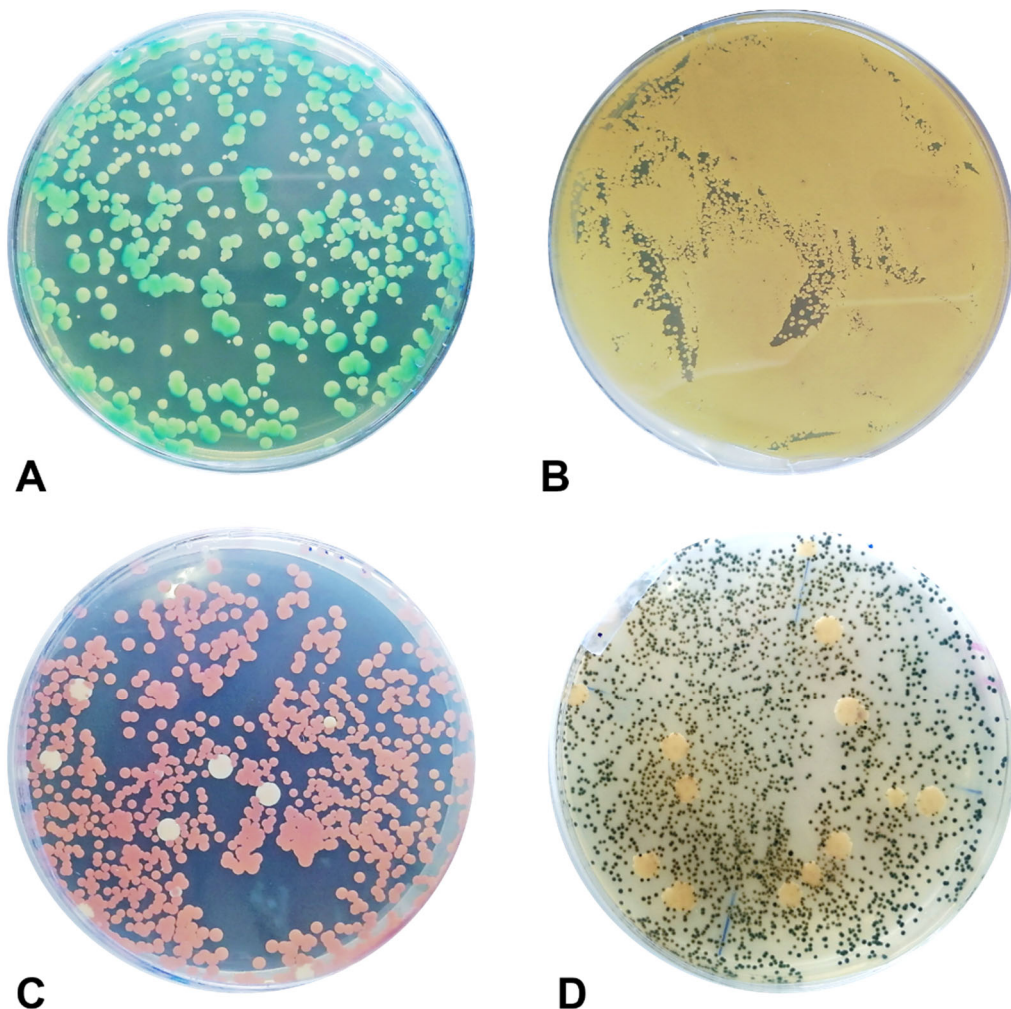
Azterketa mikologikorako 161 ahoko irakuzketa ikertu ditugu, 80 KATean eta 81 KOTean.

Onddoen hazkundera 45 laginetan lortu da (% 27,95): 20 KATean (% 25) eta 25 KOTean (% 30,90) ( $p = 0,48$ ). Kultiboen % 68,89k ( $n: 31$ ) > 50 CFUko hazkundera izan zuten, infekzio kandisiko aktiboarekin bateragarriak, KATaren % 70 ( $n: 14$ ) eta KOTaren % 60 ( $n: 15$ ) ( $p = 0,54$ ) (**13. taula**). Hala ere, paziente batek ere ez zuen ahoko kandidiasiaren datu klinikorik erakutsi jasotzen mikologikoa egin zen momentuan.

Lortutako hazkuntzen % 84,40 ( $n: 38$ ) sinpleak izan ziren, mikroorganismo bakarrekoak, KOTeko kopurua ( $n: 23$ ; % 92) KATEkoa baino handiagoa ( $n: 15$ ; % 75) izanik ( $p = 0,21$ ). Amaierako identifikazio fungikoaren ondoren, hauek izan ziren KATEko kultiboetan isolatutako espezieak: *C. parapsilosis* ( $n: 8$ ; % 40), *C. guilliermondi* ( $n: 5$ ; % 25), *C. albicans* ( $n: 4$ ; % 20) eta *C. lipolytica* ( $n: 2$ ; % 12) (**24-25. irudiak**) (**13. taula**). KOTeko kultiboetan, berriz, espezie isolatuena *C. albicans* izan zen ( $n: 7$  % 28), eta ondoren *C. parapsilosis* ( $n: 4$ ; % 17,40), *C. zeylanoides* ( $n: 3$ ; % 12), *C. glabrata* ( $n: 3$ ; % 12), *C. guilliermondi* ( $n: 3$ ; % 12), *C. krusei* ( $n: 1$ ; % 4), *C. lipolytica* ( $n: 1$ ; % 4), *C. famata* ( $n: 1$ ; % 4), *C. pelliculosa* ( $n: 1$ ; % 4) eta *C. incons. norvengen* ( $n: 1$ ; % 4) (**24-25. irudiak**). Beste forma fungiko ez-kandisiko batzuk ere identifikatu ditugu (*Debaryomyces etch. carso*, *Debaryomyces polymorphus* eta *Geotrichum spp.*) (**24-25. irudiak**) (**13. taula**).

Hazkuntzen % 15,56 (n: 7) mistoa izan zen, mikroorganismo bat baino gehiagorekin; kopuru hori handiagoa izanik KATean (n: 5; % 25) KOTean baino (n: 2; % 8) (**13. taula**). KATeko kultiboak ziren: *C. parapsilosis* + *C. guilliermondi*, *C. parapsilosis* + *Rhodomyces mucilaginosa*, *C. parapsilosis* + *C. famata*, *C. parapsilosis* + *Debaryomyces etch. carso* eta *C. lipolytica* + *C. albicans*; eta KOTekoak, ostera, *Zigossachis* + *C. albicans* eta *C. zeylanoides* + *C. lipolytica* (**24-25 irudiak**).

Ahoko irakuzketen analisia egin ondoren, ez dugu desberdintasun esanguratsurik antzeman azterketa-taldean artean *Candida* espezieei dagokienez (**13. taula**).



**24. irudia.** Ahoko irakuzketa laginen *Candida* spp. kultibo sinpleak eta mistoak. *Candida* Chromogenic Agar/CONDA plakak. **A)** *C. albicans* CFU berdeak. **B)** *C. parapsilosis* CFU arre-zuriak. **C)** *C. parapsilosis* CFU gorriak eta *Rhodomyces mucilaginosa* CFU zuriak. **D)** *C. lipolytica* CFU zuriak eta *C. albicans* CFU berdeak.



#### 4.4.1.2. Fluido periinplantarioko paper-punten lagina

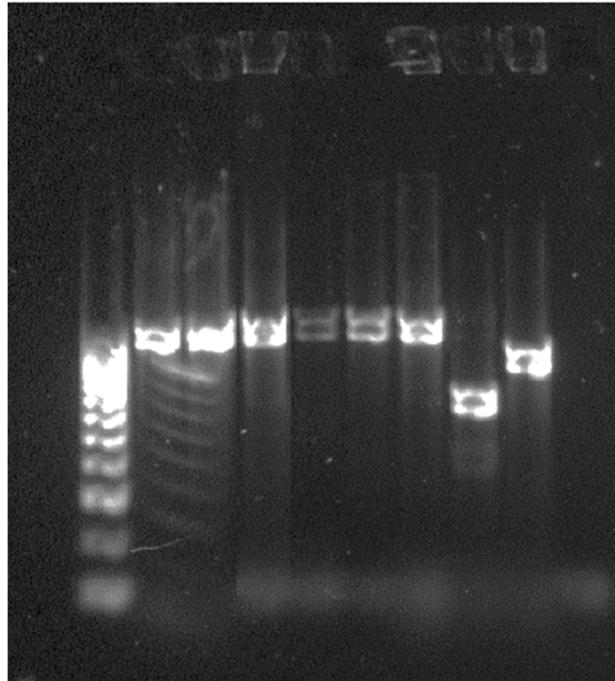
Ahoko irakuzketen laginak aztertu ondoren, paper-punten bidez hartutako 354 lagin aztertu ditugu: 146 KOTean eta 208 KATean. KOTean 81 lagin inplante osasuntsu baten fluido periinplantarioarenak ziren, eta 65 hortzetako fluido krebikularrenak. KATean, berriz, 80 lagin PIa zuten inplanteen fluido periinplantarioarenak ziren, 63 PIrik gabeko inplanteenak eta 65 hortzetako fluido krebikularrenak (**14. taula**).

KATean, hortzetako kasu batean (% 1,25) eta inplanteko 11 kasutan (% 7,70) isolatu zen *Candida spp.*: 8 PIrekin (% 10) eta 3 PIrik gabe (% 6,80) ( $p = 0,11$ ). Hazkunde guztiak sinpleak izan ziren eta hauei zegozkien: *C. albicans* (n: 3; % 37,50), *C. parapsilosis* (n: 2; % 25), *C. lipolytica* (n: 2; % 25) eta *C. glabrata* (n: 1; % 12,50) PIko inplanteetan, eta *C. parapsilosis* (n: 2; % 66,70) eta *C. glabrata* (n: 1; % 33,30) PIrik gabeko inplanteetan. Hortzeko kasua *C. parapsilosis*-i zegokion (**25-26 irudiak**). Fluido periinplantarioko kultibo gehienek > 50 CFUko hazkunde fungikoa izan zuten (**14. taula**).

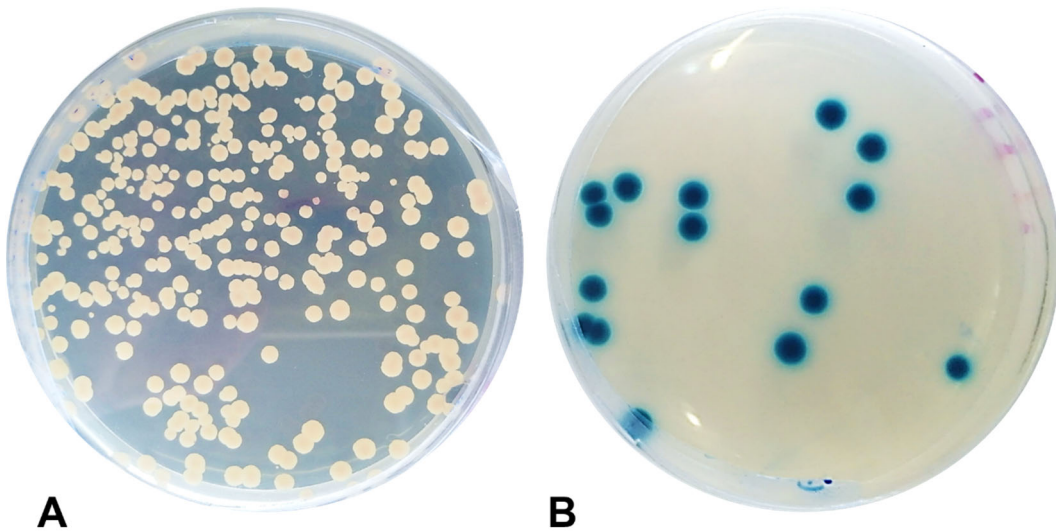
KOTean, hortzetako 2 kasutan (% 3,10) eta inplanteko 3 kasutan (% 3,70) isolatu zen *Candida spp.* ( $p = 0,84$ ). Hazkuntza guztiak sinpleak izan ziren eta hauei zegozkien: *C. glabrata* (n: 1; 33,33%), *C. pelliculosa* (n: 1; 33,33%) eta *C. holmi* (n: 1; 33,33%) inplanteetan, eta *C. holmi* (n: 22% 50) eta *C. glabrata* (n: 22% 50) hortzetan (**25-26 irudiak**). Fluido periinplantarioko kultibo batek bakarrik > 50 CFUko hazkunde fungikoa izan zuen (**14. taula**).

Paper-punten analisia egin ostean, ez dugu desberdintasunik antzeman bi azterketataldeen artean *Candida* espezieetan; ezta *Candida spp.* presentzian ere hortzetako laginen eta inplanteen artean ( $p = 0,179$ ) (**14. taula**).

Ez da erlaziorik ikusi paper-punten eta ahoko irakuzketen artean *Candida*-ren presentziari dagokionez.



**25. irudia.** qPCR. Amaierako *C. albicans* identifikazioa transiluminadorean, kontrol positibo eta negatiboekin (*C. dubliniensis* eta *C. africana*).



**26. irudia.** Paper-punten laginen *Candida spp.* kultiboak. *Candida* Chromogenic Agar/CONDA plakak. **A)** *C. parapsilosis* CFU arre-zuriak. **B)** *C. albicans* CFU berdeak.

**13. taula.** Ahoko irakuzketa laginen ustezko eta amaierako identifikazio fungikoa: taldekako analisi konparatiboa.

Datu mikologikoa	Azterketa taldea			p
	KAT: n (%)	KOT: n (%)	Guztira: n (%)	
Hazkundera (+) (-)	20 (25) 60 (75)	25 (30,90) 56 (69,10)	45 (28) 116 (72)	0,48
Kultiboa Simplea Mistoa	15 (75) 5 (25)	23 (92) 2 (8)	38 (84,40) 7 (15,60)	0,21
CFU > 50 < 50	14 (70) 6 (30)	15 (60) 8 (40)	31 (68,90) 14 (31,10)	0,54
<i>Candida</i> espezieak <i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. guilliermondi</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. zeylanoides</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. krusei</i> <i>C. pelliculosa</i> <i>C. incons. norvengen</i> <i>C. famata</i>	4 (20) 8 (40) 5 (25) 3 (12) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	7 (28) 4 (17,40) 2 (8) 2 (8) 3 (12) 3 (12) 1 (4) 1 (4) 1 (4) 1 (4)	11 (24,40) 12 (26,70) 7 (15,60) 5 (11,10) 3 (6,70) 3 (6,70) 1 (2,20) 1 (2,20) 1 (2,20) 1 (2,20)	>0,05
Beste espezie fungikoak <i>Debaryomyces etch. carso</i> <i>Geotrichum spp.</i> <i>Debaryomyces polymorphus</i>	1 (6,70) 1 (6,70) 0 (0)	1 (4) 0 (0) 1 (4)	2 1 1	>0,05

**14. taula.** Fluido periimplantarioko eta krebikularreko paper-punten laginen ustezko eta amaierako identifikazio fungikoa: taldekako analisi konparatiboa.

Datu mikologikoa	Azterketa taldea					Guztira: n (%)	p
	KAT: n (%)			KOT: n (%)			
	PI	Plirik gabe	Hortza	Plirik gabe	Hortza		
Hazkundera (+) (-)	8 (10) 62 (90)	3 (6,80) 60 (95,20)	1 (1,50) 64 (98,50)	3 (3,70) 68 (66,30)	2 (3,10) 63 (66,90)	17 (4,80) 337 (95,20)	0,84
CFU > 50 < 50	7 (87,50) 1 (12,50)	2 (66,70) 1 (33,30)	0 (0) 1 (100)	1 (3,30) 2 (66,70)	0 (0) 2 (100)	10 (58,90) 7 (42,10)	>0,05
<i>Candida</i> espezieak <i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> <i>C. lipolytica</i> <i>C. glabrata</i> <i>C. pelliculosa</i> <i>C. holmii</i>	3 (37,50) 2 (25) 2 (25) 1 (12,50) 0 (0) 0 (0)	0 (0) 2 (66,70) 0 (0) 1 (33,30) 0 (0) 0 (0)	0 (0) 1 (100) 0 (0) 0 (0) 0 (0) 0 (0)	0 (0) 0 (0) 0 (0) 1 (33,33) 1 (33,33) 1 (33,33)	0 (0) 0 (0) 0 (0) 1 (50) 0 (0) 1 (50)	3 (17,60) 5 (29,40) 2 (11,80) 3 (17,60) 1 (5,90) 1 (5,90)	>0,05

#### 4.4.2. Analisi mikologikoa, datu klinikoak eta datu zitologikoak

Ez dugu inolako loturarik ikusi pazienteen datu orokorren (generoa, adina, tabako-kontsumoa, alkohol-kontsumoa, aurrekari medikoak) eta lortutako emaitza mikologikoen artean.

Datu klinikoek dagokienez, lotura estatistikoki esanguratsua ikusi dugu KOTeko ahoko irakuzketa laginetan *Candida spp.* presentziaren eta paziente edentuloen ( $p = 0,04$ ), protesi hibrido eramaileen ( $p = 0,03$ ) eta sobredentadurak dituzten banakoen artean ( $p = 0,05$ ) (**15. taula**).

Fluido peri-inplantariotik lortutako laginetan, lotura estatistikoki esanguratsua aztertu dugu PIrik gabeko KATeko kasuetan, *Candida spp.* hazkundearen eta hedatu zitologikoko detritus ( $p = 0,02$ ) eta linfozitoen ( $p = 0,04$ ) presentziaren artean (**16. taula**).

KATeko PIDun kasuetan, lotura estatistikoki esanguratsua aurkitu dugu *Candida spp.* hazkundearen eta hedatu zitologikoko detritus ( $p = 0,05$ ) eta linfozitoen presentziaren artean ( $p = 0,047$ ) (**16. taula**).

Ez gara gai izan mukosa periinplantarioko hedatu zitologikoetan ikusitako legamien eta lagin mikologikoen *Candida spp.* presentziaren arteko harremanik ezagutzeko.

**15. taula.** Aldagai mikologikoak. Ahoko irakuzketaren analisia eta datu klinikoak.

Datu klinikoa		KOT		p	KAT		p
		Aldagai mikologikoa: n (%)			Aldagai mikologikoa: n (%)		
		Kolonizazioa			Kolonizazioa		
		(+)	(-)		(+)	(-)	
Edentulismo osoa	Ez	18 (72)	52 (92,90)	<b>0,04</b>	52 (86,60)	70 (86,40)	0,72
	Bai	7 (28)	4 (7,10)		8 (13,30)	11 (13,60)	
Protesi mota: koroak eta zubiak	Ez	22 (88)	53 (94,60)	0,29	18 (90)	57 (95)	0,79
	Bai	3 (12)	3 (5,40)		2 (10)	3 (5)	
Protesi mota: sobredentadurak	Ez	22 (88)	55 (98,20)	<b>0,05</b>	20 (100)	80 (100)	-
	Bai	3 (12)	1 (1,80)		0 (0)	0 (0)	
Protesi mota: hibridoak	Ez	18 (72)	51 (91,10)	<b>0,03</b>	16 (80)	48 (80)	0,64
	Bai	7 (28)	5 (8,90)		4 (20)	12 (20)	

**16. taula.** Aldagai mikologikoak. Fluido periinplantarioko paper-punten analisia, datu klinikoak eta datu zitologikoak.

Azterketa taldea	Datu zitologikoa	Aldagai mikologikoa: n (%)		p	
		Kolonizazioa			
		(+)	(-)		
KOT	Detritusa	Ez	2 (66,70)	8 (10,30)	0,58
		Bai	1 (33,30)	70 (89,70)	
Plirik gabeko KAT	Detritusa	Ez	0 (0)	9 (15)	<b>0,02</b>
		Bai	3 (100)	51 (85)	
Pldun KAT	Detritusa	Ez	2 (28,60)	22 (30,10)	<b>0,05</b>
		Bai	5 (71,40)	51 (69,90)	
KOT	Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin	Ez	0 (0)	0 (0)	0,43
		Bai	3 (100)	78 (100)	
Plirik gabeko KAT	Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin	Ez	0 (0)	5 (8,30)	0,12
		Bai	3 (100)	55 (91,70)	
Pldun KAT	Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin	Ez	2 (28,60)	18 (24,70)	0,96
		Bai	5 (72,40)	55 (75,30)	
KOT	Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarik gabe	Ez	0 (0)	6 (7,70)	0,20
		Bai	3 (100)	72 (92,30)	
Plirik gabeko KAT	Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarik gabe	Ez	0 (0)	13 (21,70)	0,33
		Bai	3 (100)	47 (78,30)	
Pldun KAT	Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarik gabe	Ez	3 (42,90)	25 (34,20)	0,66
		Bai	4 (58,10)	48 (65,70)	
KOT	Mikrobiota sinplea: Kokoak/ Baziloak	Ez	0 (0)	9 (11,50)	0,49
		Bai	3 (100)	49 (88,50)	
Plirik gabeko KAT	Mikrobiota sinplea: Kokoak/ Baziloak	Ez	0 (0)	14 (23,30)	0,09
		Bai	3 (100)	46 (76,60)	
Pldun KAT	Mikrobiota: Kokoak/ Baziloak	Ez	3 (42,90)	26 (35,60)	0,11
		Bai	4 (57,10)	47 (64,40)	
KOT	Mikrobiota konplexua	Ez	3 (100)	78 (100)	-
		Bai	0 (0)	0 (0)	
Plirik gabeko KAT	Mikrobiota konplexua	Ez	3 (100)	55 (91,70)	0,78
		Bai	0 (0)	5 (8,30)	
Pldun KAT	Mikrobiota konplexua	Ez	7 (100)	78 (93,20)	0,48
		Bai	0 (0)	5 (6,80)	
KOT	Mikrobiota: Kolonizatutako zelula-epitelialak	Ez	2 (66,70)	20 (25,60)	0,20
		Bai	1 (33,30)	56 (74,40)	
Plirik gabeko KAT	Mikrobiota: Kolonizatutako zelula-epitelialak	Ez	1 (33,30)	17 (28,30)	0,29
		Bai	2 (66,70)	43 (71,70)	
Pldun KAT	Mikrobiota: Kolonizatutako zelula-epitelialak	Ez	4 (57,10)	29 (39,70)	0,20
		Bai	3 (42,90)	44 (60,30)	
KOT	Hematiak	Ez	3 (100)	69 (88,50)	0,70
		Bai	0 (0)	9 (11,50)	
Plirik gabeko KAT	Hematiak	Ez	2 (66,70)	54 (90)	0,40
		Bai	1 (33,30)	6 (10)	
Pldun KAT	Hematiak	Ez	6 (85,70)	67 (91,80)	0,61
		Bai	1 (14,30)	6 (8,20)	
KOT	Hantura-zelulak: PMN	Ez	2 (66,70)	33 (42,30)	0,40
		Bai	1 (33,30)	45 (57,70)	
Plirik gabeko KAT	Hantura-zelulak: PMN	Ez	3 (100)	33 (55)	0,18
		Bai	0 (0)	27 (45)	
Pldun KAT	Hantura-zelulak: PMN	Ez	6 (85,70)	46 (63)	0,20
		Bai	1 (14,30)	27 (36)	
KOT	Hantura-zelulak: Linfozitoak	Ez	1 (33,30)	14 (17,90)	0,23
		Bai	2 (66,70)	64 (82,10)	
Plirik gabeko KAT	Hantura-zelulak: Linfozitoak	Ez	3 (100)	19 (31,70)	<b>0,05</b>
		Bai	0 (0)	41 (68,30)	
Pldun KAT	Hantura-zelulak: Linfozitoak	Ez	6 (85,70)	31 (42,50)	<b>0,05</b>
		Bai	1 (14,30)	42 (57,50)	

#### 4.5. Erregresio logistiko bitarra

Erregresio logistiko bitarrareko azterketan segimendu-denbora luzeagoa duten pazienteek OR: 1,24; KT % 95: 1,12 - 1,39;  $p < 0,01$ ) eta egunean 10 zigarro baino gehiago erretzen dituzten pazienteek (OR: 1,36; KT% 95: 1,07-1,73;  $p = 0,01$ ) PIa garatzeko arriskua handiagoa dutela antzeman dugu (**17. taula**). Aztertutako SNPetako batek ere ez zuen nabarmen handitu PI garatzeko arriskua (**17. taula**).

Lagin zitologikoetan, detritusaren (OR: 4,44; KT % 95: 2,27 - 8,52;  $p < 0,01$ ), nukleoa duten zelula epitelial ezkatatsuen (OR: 21,38; KT % 95: 8,93 - 51,14;  $p < 0,01$ ), nukleorik gabeko zelula epitelial ezkatatsuen (OR: 4,60; KT % 95: 2,30 - 9,20;  $p < 0,01$ ), koko eta baziloen (OR: 2,03; KT % 95: 1,07 - 3,84;  $p = 0,03$ ), PMNen (OR: 3,21; KT % 95: 1,64 - 6,26;  $p < 0,01$ ), hematien (OR: 4,08; KT % 95: 1,28 - 13,01;  $p = 0,02$ ) eta zelula epitelial kolonizatuen presentziek (OR: 3,38; KT %95: 1,76 - 6,50;  $p < 0,01$ ) PIa garatzeko arriskua handiagotu dute. Aitzitik, linfozitoen presentzia faktore babeslea izan da (OR: 0,40; KT % 95: 0,20 - 0,82;  $p = 0,01$ ) (**18. taula**).

Ezin izan zen erregresio-analisisia egin azterketa mikologikoan lortutako datuetan.

**17. taula.** Erregresio logistiko bitarra. Analisi kliniko eta genetikoak.

Datu klinikoa		OR (KT 95%)	p	OR (KT 95%) estua	p
Segimendu klinikoa: denbora		<b>1,22 (1,04 - 1,36)</b>	<b>&lt;0,01</b>	<b>1,24 (1,12 - 1,39)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Tabako-kontsumoa: ≥ 10 zig/egun		<b>1,35 (1,07 - 1,70)</b>	<b>0,01</b>	<b>1,36 (1,07 - 1,73)</b>	<b>0,01</b>
Protesi mota: zubiak		1,78 (0,95 - 3,35)	0,07	1,85 (0,96 - 3,54)	0,07
Gen-SNP	Genotipoa	OR (KT 95%)	p	OR (KT 95%) estua	p
GBP1 rs7911	CC	1	-	1	-
	CT	0,46 (0,189 - 1,105)	0,08	0,51 (0,20 - 1,28)	0,15
	TT	1,07 (0,421 - 2,725)	0,89	1,30 (0,49 - 3,47)	0,80
BRINP3 rs1935881	GG	1	-	1	-
	AG	0,56 (0,186 - 1,661)	0,29	0,48 (0,15 - 1,47)	0,20
	AA	1,58 (0,527 - 4,720)	0,42	1,34 (0,45 - 4,30)	0,56

**18. taula.** Erregresio logistiko multinomiala. Analisi zitologikoa (KOTeko inplanteak oinarri)

Datu zitologikoa	Azterketa taldea	OR (KT 95%) estua	p
Detritusa	Osasun	0,81 (0,43 - 1,58)	0,53
	PI	<b>4,41 (2,27 - 8,52)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleoarekin	Osasun	1,14 (0,59 - 2,23)	0,69
	PI	<b>21,38 (8,93 - 51,14)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Zelula epitelial ezkatatsuak: nukleorik gabe	Osasun	0,31 (0,11 - 0,82)	0,02
	PI	<b>4,60 (2,30 - 9,20)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Mikrobiota sinplea: Kokoak/ baziloak	Osasun	0,33 (0,17 - 0,634)	<0,01
	PI	<b>2,03 (1,07 - 3,84)</b>	<b>0,03</b>
Mikrobiota: Kolonizatutako zelula-epitelialak	Osasun	0,79 (0,40 - 1,58)	0,51
	PI	<b>3,38 (1,76 - 6,50)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Hematiak	Osasun	1,28 (0,33 - 4,96)	0,72
	PI	<b>4,08 (1,28 - 13,01)</b>	<b>0,02</b>
Hantura-zelulak: PMNak	Osasun	0,59 (0,27 - 1,29)	0,19
	PI	<b>3,21 (1,64 - 6,26)</b>	<b>&lt;0,01</b>
Hantura-zelulak: Linfozitoak	Osasun	<b>0,40 (0,20 - 0,82)</b>	<b>0,01</b>
	PI	<b>0,47 (0,24 - 0,93)</b>	<b>0,03</b>





## 5. EZTABAIDA

### 5.1. Emaidza epidemiologiko eta klinikoei dagokienez

Periimplantitisa aho-barrunbeko nahasmendu garrantzitsuenetariko bat da, hortz-implanteak dituzten pazienteen % 20 eta % 50 arteko prebalentzia izanik (Mombelli et al., 2012). Ehuneko horrek behera egiten du maila inplantologikoan, inplanteen % 20 ingururi eraginez (Kordbacheh et al., 2019), gure azterlanean lortutako zifraren antzekoa (% 28,66), bai eta Espainiako biztanlerian aitortutakoa ere (Rodrigo et al., 2018).

Ikerketa honetan ez dugu desberdintasun esanguratsurik antzeman PIko diagnostikoa duten edo ez duten pazienteetan, generoari edo adinari dagokienez, autore gehienek adierazten duten bezala (Tomasi et al., 2012; Dreyer et al., 2018; Schwarz et al., 2018).

Gaixotasun periimplantarioa kirurgia inplantologikoaren ondoren 2-3 urtetik aurrera hasi ohi da (Derks et al., 2016). Gure kasuan, inplanteak jarri zirenetik PIren diagnostiko klinikora arte igarotako batez besteko denbora  $4,61 \pm 2,50$  urtekoa izan zen, beste lan batzuetan azaldutakoaren antzekoa (Lindhe et al., 2008; Lang et al., 2011; Derks et al., 2016); hortz-inplanteak dituzten paziente guztien kontrola bizitza osorako izan behar dela azpimarratuz.

Tabakoaren kontsumoa oraindik definitzeke dagoen PIren faktore mesedegarria da (Schwarz et al., 2018). Hala ere, HGMren eragile argizat jotzen da (Rinke et al., 2011). Batetik, efektu zuzena dauka nikotinak osteoblastikoki eta angiogenikoki ugaltzea eragozten duelako; eta bestetik, zeharkakoa efektua ere badauka, kaltzioaren xurgapena eta PTH, OPG eta D bitaminaren ekoizpena ezabatzen dituelako (Sgolastra et al., 2015). Gure azterlanean PI presentziaren eta egunean 10 zigarro baino gehiagoko kontsumoaren arteko lotura esanguratsua lortu dugu. PIa agertzeko arriskua 1,36 aldiz handiagoa izan

da paziente erretzaileetan, hain zuzen ere. Haatik, badira erlazio hori aitortu ez duten beste ikerketa-lanak (Aguirre-Zorzano et al., 2015; Dalago et al., 2017). Alde horiek tabako-kontsumitzaileak definitzeko homogeneotasun ezak eta erretzen den tabako-kopuruek eragingo lituzkete. Gure azterketan, beste azterlan batzuen antzera (de Araujo Nobre et al., 2014; Derks et al., 2016), tabakoaren kontsumoa arrisku-faktore independentea izan da. Alkohola bezalako beste elementu toxiko batzuen kontsumoa ez da PIarekin erlazionatu gure parte-hartzaileetan, orain arte beste ikertzaile batzuek adierazi duten bezala (Carr et al., 2021).

Pazienteen aurrekari medikoei dagokienez, ez dugu harremanik ikusi PIren eta gaixotasun sistemikoren bat izatearen artean. Aspalditik esan izan da diabetes mellitusa PIren garapenari lotuta egon daitekeen patologia dela (Ferreira et al., 2006). Hala ere, haren inplikazioa aztertzen duten ikerketa gehienek ez dute datu garrantzitsurik jasotzen, pazienteen maila gluzemikoa esate baterako (Taylor eta Borgnakke 2008), edo ez dute beste kofaktore batzuetatik bereizten, tabakoa edo periodontitis aurrekaria kasu (Daubert et al., 2015). Gure ikerketan ez dugu gaixotasun honekin inolako harremanik ezagutu, beste autore batzuen moduan (Roos-Jansaker et al., 2006; Maximoa et al., 2008; Costa et al., 2012; Marrone et al 2013; Renvert et al., 2014; Derks et al., 2016; Rohn et al., 2017). Genco et al., (2013) bezala, pazienteen datu analitikoak kontuan hartuta azterketa gehiago egin behar direla uste dugu, elkartze posible hori behar bezala balioztatzeko.

PIrekin zerikusia edukiko luketen beste patologia sistemiko batzuk gaixotasun kardiobaskularra, artritis erreumatoidea, osteoporosia, hipotiroidismoa edo gaixotasun hepatikoa dira; nahiz eta lortutako emaitzak eztabaidaezinak izan (Koldsland et al., 2011; Maximoa et al., 2008; Renvert et al., 2014). Guk ere, ez dugu nahasmendu horien eta PIDun pazienteen arteko loturarik identifikatu, ezta beste prozesu interesgarri batzuen artean ere, hala nola depresioa (Wang et al., 2022; Strooker et al., 2022) (**1. taula**). Espero

zitekeen bezala, aztergai dugun biztanleriaren adina kontuan hartuta, hipertentsio arteriala izan da gaixotasun sistemiko ohikoena bi azterketa-taldeetan.

Aspalditik jakin da periodontitisaren aurrekaria PIren garapenerako arrisku-faktore garrantzitsuenetarikoa dela (Roccuzzo et al., 2012; Polymeri et al., 2022). Izan ere, mantentze-terapia periodontalera joaten ez diren pazienteetan PIa izateko arriskua 14 aldiz handiagoa izan daitekeela adierazi dute inbestigatzaile askok (Ferreira et al., 2006; Rohn et al., 2017). Gainera, hartz-inplanteen bidezko tratamenduan zehar periodontitis aktiboa egoteak 4 eta 7 aldiz handitzen du PI garatzeko probabilitatea (Koldslund et al., 2010; Koldslund et al., 2011; de Araujo Nobre et al., 2015; Renvert et al., 2014; Dalago et al., 2017; Maximoa et al., 2008; Daubert et al., 2015). Gure azterketan, ez dugu lotura esturik ikusi PIren agerpenaren eta gaixotasun periodontalaren aurrekariaren artean, Marrone et al.-ek (2013) eta Canullo et al.-ek (2016) aipatutakoarekin bat etorritz. Eraitza hori azaltzeko arrazoi nagusia, bi azterketa-taldeetan sartutako paziente gehienek mantentze-terapiara zorrotz bat jarraitzen zutela izango litzateke, aldizkako kontrol hobeagorekin, Canullo et al.-en (2016) antzera.

Hortzeriari dagokionez, ez da inolako erlaziorik ezagutu edentulismo osoaren eta PIren presentziaren artean, ikerketa gehien moduan (Dreyer et al., 2018; Strooker et al., 2022). Beheko masailezurrean eta atzeko sektorean hortzik gabeko paziente gehiago zeuden, estatu mailan publikatutako datuekin pareko (Bravo-Pérez et al., 2020).

Bestalde, zubien bitartez egindako errehabilitazio protesikoen eta PIren agerpenaren arteko lotura antzen dugu ( $p = 0,046$ ). Hainbat autore (Gampe et al., 2017; Alhammadi et al., 2021) nabarmen handiagoa den HGMA adierazi dute zubidun inplanteetan banakako koroak dituzten inplanteak baino. Eraitza horrek inplantearen supraegitura diseinatzeko zailtasunarekin, berrezarpen-pilarearen arteko lotura desegokiarekin edota gehiegizko

zementuarekin erlazioa izan dezake; asko galaraziko bailuke ahoko higiene egokirako sarbidea, PIren garapena erraztuz (Lang et al., 2011; Jepsen et al., 2015). Are gehiago, eremu horiek (% 65) higienerako eremu irisgarriek baino periinplantitis tasa handiagoa dutela (% 18) frogatu da (Serino & Strom, 2009).

Diagnostiko klinikoaren momentuan, PIa zuten inplanteen batez besteko ZS  $5,13 \pm 1,3$  mm-koa izan zen, HGMrena  $5,55 \pm 1,1$  mm-koa eta inplanteen kopuru handi batek (% 56,20) BOP zuen; azterlan gehienetan lortutako emaitzekin bat etorriz (Karoussis et al., 2003; Ferreira et al., 2006; Maximoa et al., 2008; Costa et al., 2012; Marrone et al., 2013; de Araujo Nobre et al., 2015; Dalago et al., 2017; Schwarz et al., 2018).

## 5.2. Emaidza genetikoei dagokienez

Gaixotasun periinplantarioaren testuinguruan gehien aztertu diren SNPak hanturazko interleukina proinflamatorioei dagozkie: IL1 (+3953) eta IL1 (-511); hala ere, oraindik ez da frogatu PIko agerpenarekin lotura argia dutenik (Esposito et al., 1998; Eguia et al., 2018; Lafuente-Ibáñez de Mendoza et al., 2022). Feloutzis et al.-ek (2003) eta Gruica et al.-ek (2004) bakarrik aipatu dute IL1 (+3953) SNPren eta HGMren arteko erlazioa egunean 20 zigarro baino gehiago erretzen duten pazienteetan, baina ez periinplantitisarekin zuzenean. Loturarik eza, eta EAEko populazioan SNP hori ez egotea dela eta, IL1 (+3953) SNPa ez zen gure azterketan sartu.

Periodontitis kronikoaren garapenarekin erlaziotu den IL1 (-511) SNPa bai aztertu dugu (Yoshie et al., 2007). Izan ere, zenbait egile (Shimpuku et al., 2003; Lin et al., 2007) dagoeneko elkartu dute SNPa hori  $\geq 0,5$  mm-ko HGM duten PIDun pazienteekin. Hala eta guzti ere, HGMA PIren lehen zeinua izan daitekeen arren, azken diagnostikoa beste parametro kliniko batzuekin berresten da gaur egun (BOP, PS eta zundaketaren zornea) (Schwarz et al., 2018); eta, beraz, azterketa horietan sartutako PIDun kasu batzuk (Shimpuku et al., 2003; Lin et al., 2007) osasun periinplantario gisa birsailka daitezke. Gure kasuan bezala, beste autore batzuk (Laine et al., 2006; Melo et al., 2012) ez dute erlazio hori behatu PI irizpide diagnostiko zehatzagoak erabiliz. Hori guztia dela eta, IL1 $\alpha$  (-511) SNPak ez lukeela lotura zuzenik izango PIarekin deritzogu, behintzat EAEko biztanlerian.

Birmoldaketan eta hezurretako homeostasian garrantzitsuak diren beste interleukina batzuk IL10 eta IL6 dira. IL10 hanturaren aurkako zitokina bat da, IL1, TNF $\alpha$  eta zelulaz kanpoko matrizearen beste proteina batzuen sintesia murrizten baititu (gelatinasa, kolagenasa). Era berean, bereizketa osteoplastikoa bultzatzen du eta aktibazio

osteoklastikoa inhibitzen du (Zhang et al., 2014). Haatik, oraindik ez da onartu IL10 (-1081) SNPren eta PI agerpenaren arteko loturarik, gure azterketan gertatu den bezala (Gurol et al., 2011; Petkovic-Curcin et al., 2017). Emaidza hauek IL6 (-174) SNPren lortutakoen parekoak dira, non Serbiako pazienteetan bakarrik erlazionatu zen (Melo et al., 2006; Ladeira-Casado et al., 2013; Petkovic-Curcin et al., 2017). IL6ak paper bikoitza du hezurren birmoldaketan. Alde batetik, baldintza normaletako hezur-birxurgapena ezabatzen du, osteoklastoen gurasoen bereizketa inhibitzen baitu; eta, bestetik, RANKLaren adierazpena eragiten du baldintza inflamatorioetan, guraso osteoklastikoen ugaritzea erraztuz (Yoshitake et al., 2008). Horregatik, IL6 (-174) SNPri eta Piri buruz lortutako datuak eztabaidagarriak izan daitezke (Melo et al., 2006; Ladeira-Casado et al., 2013). Gure kasuan ezta, ez gara gai izan mutazio horren eta PIren agerpenaren arteko erlazioa ezagutzeko.

Jarduera osteoklastikoa CD14k eta RANKLk (Massey eta Flanagan, 1999) modulatu dute; izan ere, CD14 proteinak monozitoen bereizketa arautzen du, eta RANKLk osteoklastogenesia eragiten du jada helduak diren osteoklastoetan (Sørensen et al., 2007). Serbiako eta Alemaniako populazioan orain arte SNPei buruz egindako lanek ez dute loturarik aurkitu CD14 (-159) SNPren eta PIren garapenaren artean (Rakic et al., 2015; Petkovic-Curcin et al., 2017). Ezta RANKL (-438)-ren inguruan egindakoek ere, irandar eta brasildar biztanlerian (Kadkhodazadeh et al., 2013; Ribeiro et al., 2017; Reis et al., 2020). Emaidza horiek bat datoz EAeko biztanleriarekin egin dugun azterlanean lortutakoekin.

Hezuraren birmoldaketan inplikaturako beste proteina bat LTF glikoproteina transferrina da, listu-jariaketan eta granulu neutrofiliko inflamatorioetan kokatzen dena (Naot et al., 2005). Baldintza fisiologikoetan, LTFa infekzio bakterianoen aurkako defentsa-faktore antimikrobianoa eta immunomodulatuzailea da, periinplantopatogenoak barne (Naot et al.,

2005). Jakina da LTFak hezur-matrize berria sortzeko ugaritze eta bereizte osteoblastikoa ere estimulatu duela. Are gehiago, OPG eta RANKen elkarketa inhibitzen du. (Naot et al., 2005). Hala ere, brasildar autore talde batek bakarrik aztertu du LTF rs1126477 SNPren eta PIren elkarketa (Doetzer et al., 2015), eta emaitza positiborik gabe, gure azterlanaren moduan. Datu hauek aztertu ditugun PIDun pazienteek aldaera patogeniko espezifikoak dituztela adieraziko lukete.

PIa duten eta ez duten pazienteen artean egindako analisi konparatiboan, alde nabarmenak ikusi ditugu gutxi ikertutako beste SNPen presentziari dagokionez: GBP1 rs7911 eta BRINP3 rs1935881.

GBP1 zelula endotelialetan eta T linfozitoetan (CD4 eta CD8) adierazten den proteina da (Honkala et al., 2020). GBP1 entzimak PAMPen aurkako erantzun zelular makrofagikoa erregulatzen du (Honkala et al., 2020); bai eta ugaltze epiteliala eta endoteliala murriztu hanturazko erantzunaren ebazpenean ere (Capaldo et al., 2012; Forster et al., 2014). Gainera, GBP1ak paper garrantzitsua betetzen du zelula-immunitate autonomoan, zelula-barneko patogenoen aurka (Tietzel et al., 2009; Zhu et al., 2013). Horregatik guztiagatik, GBP1en mutazioak PI prozesuan inplikaturako periinplantopatogenoen aurkako erantzun inflamatorio ez-eraginkorra eragin lezakeela uste dugu.

Bestalde, GBP1 rs7911 SNPa *Epstein-Barr* birusak eragindako infekzio kroniko aktiboan inplikaturata dagoela frogatu da (Kim et al., 2011). Alabaina, oraindik ez dago polimorfismo hori PIren testuinguruan aztertu duen ikerketarik, gurea izan ezik. Gure iritziz, PIan parte hartzen duten periinplantopatogeno asko (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, etab.) zelula-barneko patogenoak direnez, azterlan gehiago egin beharko lirake beste eremu geografikotako biztanleria taldeetan, SNP hori aztertzeko eta PIren garapenean duen benetako rola ezagutzeko.



BRINP3 TGF familiako hezur proteina morfogenetiko bat da, hezur eta konektibo ehunen neoformaziorako gaitasun inductorea duena (Kawano et al., 2004). BMPak osteoguraso zeluletan adierazten diren 15 proteina dira, osteoblastoen bereizketaz arduratzen direnak, hezurren birmoldaketa eta birsortze prozesuetan (Anderson et al., 2000). Era berean, zelula pluripotentialak hainbat zelula-lerrotan bereiztea sustatzen dute: ehun adiposoan, kartilagoan eta hezurrean. Brasilgo egile talde batek soilik (Casado et al., 2015) aitortu du BRINP3 rs1935881 presentziaren eta populazioan PIren garapenaren arteko lotura. Gure emaitzakein bat datozela ikusita, polimorfismo horrek aldeketak eragin ditzakeela osteointegrazio periinplantarioan uste dugu, PIa agertzea erraztuko lituzketenak.

Harreman horiez gain, gure azterlanean zenbait SNPren elkarte esanguratsuak identifikatu ditugu PIrekin eta arrisku-faktore esanguratsuekin.

Egunean 10 zigarro baino gehiago erretzen zituzten PIDun pazienteek OPG rs2073617 SNParen presentzia esanguratsua erakutsi zuten. OPG osteoblastoen gainazalean adierazten den proteina inportantea da. Izan ere, RANKL hartzailen antagonista gisa jarduten du, RANKarekin lotzen denean, hezuraren birxurgapena saihestuz (Wright et al., 2009). Jada, bi ikerketa talde desberdinek (Kadkhodazadeh et al., 2012; Zhou et al., 2016), frogatu dute OPG rs2073617 SNParen eta PIren agerpenaren arteko lotura. Aspalditik dakigu paziente erretzaileek OPG gutxiago ekoizten dutela, eta OPG kontzentrazio txikiagoa dutela fluido krebikularrean, ziurrenik nikotinak osteoblastotan duen eraginaren ondorioz (Tanaka et al., 2006; Lappin et al., 2007). Neurri batean, aktibitate honek PIDun paziente erretzaileek duten hezur-galera azalduko luke, (Liu et al., 2002; Mogi et al., 2004), gure azterlanean gertatuko litzatekeen bezala.

Periimplantitisa eta diabetes mellitusa zuten pazienteek BMP4 rs17563 eta FGF3 rs1893047 polimorfismoen presentziaren erlazio esanguratsua erakutsi zuten.

BMP/FGF ardatza hortz-inplanteen osteointegrazioarako euskarri garrantzitsuenetariko bat da (Marie, 2003; Patel et al., 2008). BMPak eta FGFak hezurren eta odol-hodien birsorkuntzan aktiboki parte hartzen duten bi TGFen proteina-talde dira (Anderson et al., 2000). Proteina hauen askapenak zelula osteogurasoen eta fibroblastoen ugalketa handitzen du, hain zuzen ere (Guimarães et al., 2013). BMP4ak zeregin garrantzitsua du helduaroko hezur-hausturak sendatzeko, eta, haren aldaketa genetikoak menopausia osteko emakumeen hezur-dentsitatea murriztearekin lotu dira (Ramesh et al., 2005). Hezur-jarduera horrekin batera, BMPek glukosaren homeostasia, pankrea-uharteen morfogenesisia eta pankreako  $\beta$  zelula-masak erregulatzen dituztela frogatu da (Pauk et al., 2019; Schulz & Tseng, 2009; Goulley et al., 2017). Zehazki, BMP4k adipozitoek glukosa hartzea murrizten du eta intsulina seinaleztatzean eragin antagonikoa du, berarekiko erresistentzia eraginez (Ahrens et al., 1993; Bowers & Lane, 2007; Chattopadhyay et al., 2017). Azken funtzio horrek BMP4 rs17563 SNP PIDun paziente diabetikoen agerpena azalduko luke (Perera et al., 2019), gure azterlanean aitortu dugun bezala.

Bestalde, FGF3a proteina mitogeniko osteoblastiko, fibroblastiko eta endoteliala da, angiogenesisia eta zauriak sendatzea sustatzen duena, matrice kolageniko berriaren sorrera estimulatzeko baitu (Anderson et al., 2000; Guimarães et al., 2013). FGFak eta horien hartzaileak molekula garrantzitsuak dira pankrearen eta uhartetxo pankreatiko helduen garapenean (Arnaud-Dabernat et al., 2007). Horregatik, molekula honen mutazioak alterazioak eragin ditzake insulinararen jariatzean eta, neurri batean, lortu ditugun emaitzak azaldu.

Orain dela gutxi, Coelho et al.-ek (2016) BMP4ko eta FGF3ko SNPen eta Brasilgo PIDun pazienteen artean lotura esanguratsua dagoela aipatu dute, diabetesa aurkeztea aipatzen ez duten arren. Dena den, diabetes mellitusa duten pazienteen kopurua txikia izan da gure

azterlanean eta, beraz, antzemandako emaitza horiek beste azterketekin indartu beharko lirateke.

Atal honen eztabaida amaitzeko, erregresio-analisia egin ondoren hasiera batean Piren presentziarekin lotutako SNPek (GBP1, BRINP3, OPG, BMP4, FGF3) ez dutela Piren arriskua handiagotzen esana beharra dago.

### 4.3. Datu zitologikoei dagokienez

Ahoko esfoliazio-zitologia ahoko mukosaren berezko edo artifizialki esfoliatutako zelulen ezaugarri morfologikoen azterketan eta interpretazioan datza (Acha et al., 2005; Cecilia et al., 2014). 1967an, Lange hortzoiko mukosaren lehen azterketa histomorfologiko eta zitomorfologikoa egin zuen Papanicolaouarekin tindaketarekin, epitelio marjinala karrakatuz (Lange, 1967). Hortzoi osasuntsu baten hedatu zitologikoen azaleko zelulak erakusten dituzte eta, kopuru txikiagoan, baita estratu arantzaduneko bitarteko zelulak ere (Diniz-Freitas et al., 2004).

Gaixotasun periodontalean atzemandako aurkikuntza zitologikoa beste hantura-prozesu batzuetan lortutakoen parekoak dira (Koss, 1961): tindaketa gutxiko zelula-hondarrak (detritus), leukozito polimorfonuklearrak eta hematiak (Saki et al., 1960). Orain arte, oso ikerketa gutxi balioztatu dute zitologia esfoliatiboaren erabilera gaixotasun periodontalaren kontrol eta diagnostikorako metodo gisa (Stahl, 1967; Cecilia et al., 2014).

Hantura periodontalak epitelioaren keratinizazio-gaitasuna murrizten du, azaleko zelulen ezkatatzea eta esfoliazioa erraztuz, eta geruza sakonenetako keratinozitoen ugaritzea areagotuz (Lange, 1965; Endo et al., 2008). Cecilia et al.-ek (2014) periodontitisa zuten pazienteen hortzoiko lagin zitologikoen zelula ezkatatsuen (azalekoak eta tartekoak) eta PMNen kopuru handiagoa zutela frogatu zuten. Halaber, gaixotasunaren larritasunari dagokionez desberdintasun esanguratsuak antzeman zituzten ere bai; periodontitis agresiboko kasuek zelula epitelial eta PMN gehiago baitzituzten (Cecilia et al., 2014).

Mukosa periinplantarioko hedatu zitologikoen behaketa oso ikerketa-talde gutxi aztertu dute (Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014). Aitzitik, badakigu PIko laginek bakterio-kolonia eta hantura-zelula akutu eta kroniko gehiago dituztela. Inplante

osasuntsuen eta PIDun inplanteen mukosa peri-inplantarioaren profil zitologikoa aztertzen duen lehen azterlana gurea da; baita PIren alderdi kliniko-patologikoekin lotzen duena ere. Balioetsi daitezkeen elementu zitologikoen analisia baliagarria izan daiteke gaixotasun periinplantarioaren diagnostikoa eta larritasun-ebaluazioa egiteko, diagnostiko-metodo osagarri simple, erraza, eta minimoki oldarkorra delako.

Epitelio-zelulak hedatuetan gehien ikusi diren elementu zitologikoak izan dira, ugariagoak izanik PIDun laginetan. Emaidza hauek Cecilia et al.-ek (2014) periodontitis oldarkorreko pazienteen antzetakoak izan dira. PIrik gabeko mukosa periinplantarioan ikusitako zelula epitelialak PIko kasuetan baino sakabanatuago zeuden. PIDun hedatuetan, berriz, keratinozitoen zelula multzoak identifikatu ditugu, beste elementu batzuekin batera (detritusa eta bakterio-koloniak, batez ere).

Mukosa periimplantarioa epitelio lau geruzatua da, keratinizazio-maila desberdinak erakutsi ditzakeenak, keratinizaziorik gabe, parakeratinizatua edota ortokeratinizatua (Berglundh & Lindhe, 1996; Araujo & Lindhe, 2018). Epitelioaren azaleko geruzetan dauden zelula epitelial nukleatuak, eremu ortokeratinizatuei dagozkie. Ortokeratosia ahoko mukosaren faktore babeslea da, lodiera eta erresistentzia handiagoa ematen baitizkio, eta kanpoko agente narritatzaiileen aurrean lehen defentsa-lerroa da, periinplantopatogenoak barne (Groeger & Meyle, 2019). Hantura periinplantarioak, ahoko mukosak jasaten duen birmoldaketa epitelial fisiologikoaren fenomenoarekin batera, keratinizazioa galtzea eta ikusi dugun nukelarik gabeko zelula epitelialen identifikazioa azalduko lukete.

Nukleoa mantentzen duten zelulen presentzia mukosa periinplantarioaren hedatu zitologikoak balioztatzeko datu garrantzitsua da. Zitologia-hedatuetan tarteko keratinozitoen behaketak askatzen diren mukosa labainagoa dela iradoki dezake, azpiko

hantura-prozesuak epitelioa kaltetzeko gai diren bitarteko proinflamatoriak jariatzen dituelako (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ) (Kamekura et al., 2015; Yulis et al., 2018). Keratinizazioa murrizteak eta atrofia epitelialak mukosa periinplantarioa ahuldu, eta mikrobioen infekzio- eta hantura-prozesua erraztuko lukete.

Mukosa periinplantarioaren lodiera hortzetako mukosarena (2,0 mm vs 1,1 mm) baino handiagoa dela deskribatu da (Chang et al., 1990; Chang & Wennström 2013; Parpaiola et al., 2015). Egun, hortzoi keratinizatuaren presentzia PIren patogeniarako oso faktore garrantzitsua dela badakigu (Wennstrom & Derks, 2016). Izan ere, hainbat ikerketek frogatu dute (Gobbato et al., 2013; Lin et al., 2013; Ladwein et al., 2015; Esfahanizadeh et al., 2016; Souza et al., 2016; Ueno et al., 2016) 2 mm baino gutxiagoko hortzoi keratinizatuak bakterio-plakaren metaketa handiagoarekin eta BOP altuagoarekin lotzen dela, higiene periinplantarioa zailtzen eta hantura-prozesua areagotzen baitu. Bestalde 2 mm-tik beherako mukosa keratinizatuak PIren agerpenarekin erlazionatzen da ere bai (Canullo et al., 2016; Rocuzzo et al., 2016).

Nukleorik gabeko azaleko zelula eta nukleo mantentzen duten tarteko zelula gehiago identifikatu ditugu PIren mukosa periinplantarioko hedatuetan, eta horrek askatze epitelial handiagoa gertatzen ari dela adieraziko luke, hantura-prozesuak lagunduta. Zelula epitelial nukleatu eta anukleatu ugari ikustea mukosa periinplantarioko hedatu zitologiko batean, PI izateko arriskua 21 eta 4 aldiz handiagoa ematen du, hurrenez hurren.

Detritus eta bakterio-metaketak (kokoak eta baziloak) mukosa peri-inplantarioaren zitologia hedatuaren azterketan identifikatzeko bi elementu garrantzitsu dira. Gure analisisian, PIa zuten pazienteen laginek detritus eta bakterio-metaketa kokazeo eta bazilar osagai esanguratsu handiagoa erakutsi dute.

Ahoko zitologian, detritusa material organikoen hondarrez osatutako konglomeratu irregularra da, normalean basofiloa dena, eta zelula epitelial eta inflamatorioz osatua, bai eta elementu mikrobiano desberdinez (Saki et al., 1960). Beste azterlan batzuk (Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014) antzeko emaitzak lortu dituzte, PIko kasuetan mikrobiota ugariagoa dela frogatuz, eta osasun periinplantariokoetan, aldiz, urriagoa.

Bakterio-plaka metatzea gaixotasun periinplantariorako arrisku-faktore nagusia da (Costa et al., 2017; Heitz-Mayfield & Salvi, 2018). Izan ere, kolonizazio periinplantopatogenoa hortz-inplanteak jarri ondorengo lehen astean hasten da (Quirynen et al., 2006). Are gehiago, hainbat ikerketek (Koldsland et al., 2011; Rinke et al., 2011; Marrone et al., 2013; de Araujo et al., 2015; Canullo et al., 2016; Monje et al., 2017) erakutsi dute PI intzidentzia handiagoa plaka-indize altua eta higienarako sarbide okerragoa duten eremuetan. Gure azterlanean, mikrobiota-metaketaren presentziak hedatutako zitologikoetan 2 aldiz handiagoa du PIa garatzeko arriskua.

Rams eta Link (1983) inplante osasuntsuen (mikrobiota sinplea) eta PIDun inplanteen (mikrobiota konplexua) arteko desberdintasun mikrobiologikoak adierazi zituzten lehenengoak izan ziren (Rams et al., 1984). Gure analisisian, formazio mikrobiano konplexuak (“arto-buruak” taldeak, espiroketak) ohikoagoak izan dira PIDun inplanteei dagozkien hedatuetan.

Hortz-plaka polisakaridoak eta produktu bakterianoak dituen matrize itsaskor batean ahoko bakterioak metatzearen emaitza da (Lancy et al., 1980). Heldu ahala, hasierako mikrobiota, batez ere koko Gram positiboa, bazilo Gram positiboekin, koko Gram negatiboekin eta forma hariztatuekin nahasten da (Ritz, 1967). *S. sanguis* bakterioa hortz-gainazala kolonizatzen duen lehen mikroorganismoetako bat da, listu-glikoproteinengatik duen kidetasunagatik (Carlsson, 1967; Carlsson et al., 1970). 1972an, Jonesek (1972)

mikrobio-erlazio berria ikusi zuen *S. sanguis* kokoetan, mikroorganismo hariztatu baten kanpoko azalerari itsatsita zeudenak, “arto-buruen” antzeko formazio konplexuak eratuz (Listgarten et al., 1965). Egitura berezi horiek 10. egunetik aurreragoko hortz-plaka helduan agertu ohi dira, eta *S. sanguis* espezieko 10 kokok osatzen dituzte, *Bacterionema matruchotii* baten inguruan (Listgarten et al., 1965; Takazoe et al., 1978; Lancy et al., 1980).

Gure azterlanean, lehen aldiz ondorioztatu da mikrobio-forma konplexu horien presentzia nabarmen handiago dela 5 mm-tik gorako ZS eta HGM duten PIDun inplanteetan. Hortaz, PIa duten inplanteen inguruko plaka bakterianoaren egitura-antolamendua gaixotasun periinplantarioaren progresioarekin eta larritasunarekin lotuta egongo litzateke; horrela, hortz-inplante osasuntsu bateko mukosak plaka bakteriano sinple eta gaztearen metaketak erakutsiko lituzke, eta periinplantitisarenak, berriz, plaka bakteriano konplexu eta helduaren kumulua (Lucchese et al., 2014). Desberdintasun horiek PI duten pazienteak diagnostikatzeko eta monitorizatzeko baliagarriak izan daitezkeela ustea dugu.

Zelulen arteko mikrobio inbasioa zelula-barnekoa baino ohikoagoa den arren, zelula-barneko infekzio polimikrobiano aktiboa (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*) oso arrunta da periinplantitisa duten keratinozitoetan (Rudney et al., 2005; Rudney et al., 2006; Tribble & Lamont, 2010). Inbaditutako zelulek elikagaietan aberatsa den eta zelula immunologikorik gabeko ingurunea ematen diete bakterioei, eta horrek erreplikazioa eta antibiotikoekiko erresistentzia errazten du, haien ezabatzea zailduz eta hantura mantentzea ahalbidetuz (Eick et al., 2004; Johnson et al., 2008). Zelula barneko bakterioak ostalariaren defentsak saihesten saiatzen dira (bakuola azido lisosomalak) (Dorn et al., 2000), birulentzia faktore desberdinen bitartez, hala nola seinalizazio zelularreko bide nagusien birprogramazioa, proteasen jariaketa, ehun periinplantarioen suntsiketa mantentzen dituztenak (Huang et



al., 1998; Huang et al., 2001; Yun et al., 2001; Grayson et al., 2003; Huang et al., 2004; Sheets et al., 2005; Ji et al., 2007; Stathopoulou et al., 2009; Tam et al., 2009). Aurkikuntza horiek germenek kolonizatutako zelula epitelialak PIko progresioaren eta agresibitatearen adierazle izatea azalduko lukete; haien agertzeak PI garatzeko arriskua 3 aldiz handiagotzen baitu.

Ehun periinplantarioen kolonizazio bakterianoak ostalariaren erantzun immunologikoa baldintzatzen du, maila baskularreko eta zelularreko aldaketekin, zelula inflamatorio kronikoak (linfuzitoak) eta akutuak (PMNak) erakarriz (Sanz et al., 2001). PIren hantura-profila mistoa da oro har, eta linfuzitoek, PMNek, makrofagoek eta zelula plasmatikoek osatzen dute (Bullon et al., 2004; Konttinen et al., 2006). Zitologikoki, PIko hedatuek PMN gehiago dituzte (Guallini et al., 2003; Olmedo et al., 2013; Lucchese et al., 2014), gure azterlanean nabarmen ikusi dugun bezala.

PMNak hantura-erantzun akutuaren zelula nagusiak dira, eta funtsezko zeregina dute ehun periinplantarioaren osteoklastogenesian (Kawai et al., 2006). Monozitoak osteoklastoetan bereizteko, RANKa bere ligandoari (RANKL) lotu behar zaio (Asagiri & Takayanagi, 2007). RANKLren etorrera monozitoen eta periodontoaren zelulen arteko elkarrekintzagatik gertatzen da, PMNak, T eta B linfuzitoak eta hezur marjinalaren osteozitoak barne (Sokos et al., 2015). Infekzio periiinplantopatojenok berezko erantzun immunea baldintzatzen duela badakigu, bereziki PMNen kontura (Steeve et al., 2004; Zhang et al 2007; Kocgozlu et al., 2009). PMNek zitokina proinflamatorioen jariaketa ere estimulatu dute ( $IL1\alpha$ ,  $TNF\alpha$ ), hezurretako ekintza birxurgatzailea indartzen dutenak eta RANKLaren menpe ez daudenak (Steeve et al., 2004; Zhang et al 2007; Kocgozlu et al., 2009). PMNen jardura osteoklastogenikoa aktibatutako T eta B linfuzitoek ere modulatu dezakete (Kong et al., 1999; Hofbauer et al., 2000; Wu et al., 2005; Riegel et al., 2012). Bestalde, linfuzitoek hezur ehuna suntsitzen duten zitokinak ere jariatzen

dituzte, neurri txikiagoan bada ere (IL1, IL6, TNF $\alpha$ ) (Teitelbaum, 2000; Choi et al., 2001; Wei et al., 2005).

Aldez aurreko ezagutza horretan oinarrituta, mukosa periinplantarioaren hedatu zitologikoek haren hantura-egoerari buruzko informazio oso baliagarria eman dezaketela uste dugu. Alde batetik, PMNen presentzia hantura akutu eta suntsitzailearen adierazle izango litzateke, hezurren birxurgatze-maila handiagoarekin; eta beste batetik, linfzitoen presentzia, immuno zaintza babeslearen erantzun kroniko bati egongo litzateke lotuta, aurrerabide suntsitzailea geldituz. Hipotesi hori PIDun hedatuetan PMN kopuru handiagoa identifikatzeak indartzen du, PI izateko 3 aldiz arrisku handiagoa baitakar. Aitzitik, PIrik gabeko hedatuetan linfzito-kopuru handiagoa izatea elementu babeslea izan da.

Bitxia bada ere, hematien presentzia gure azterlaneko prestaketa zitologikoetan gutxien ikusi den datu zitologikoa izan da; handiagoa izanik, hala ere, PIko mukosaren hedatuetan.

BOPa parametro kliniko garrantzitsua da patologia periinplantarioan, eta, PIan ez ezik, beste hantura-koadro batzuetan ere ager daiteke, hala nola MPIan. MPIa inplante endoseo bat inguratzen duen mukosaren hantura-lesio gisa deskribatu da, euskarriko hezuraren galerarik gabe (Albrektsson & Isidor, 1994; Zitzmann & Berglund, 2008). MPIren zeinu klinikoak eritema, mukosa periinplantarioaren hantura eta BOPa dira (Lindhe & Meyle, 2008; Heitz-Mayfield & Salvi, 2018). MPIa PIko bihurtzeko tasa handia da, % 40ra artekoa (Costa et al., 2012); beraz, mukosa periinplantarioaren hedatu zitologikoetan globulu gorriak identifikatzeak ehunaren ahultasun handiagoa ekarriko luke, eta baliagarria izan liteke PI baten hasiera baloratzeko MPI batetik trantsizio gisa.

Gure azterketan, ikerketa azpitalde guztietan aztertu dugu korrelazio esanguratsua detritus, mikrobiota sinple, PMN eta linfuzitoen presentziaren artean ( $p < 0,05$ ). Haatik, PIDun lagin zitologikoetan bakarrik lortu dugu hematien eta PMNen presentziaren arteko lotura estatistikoki zuzena ( $p < 0,01$ ) (**5. eranskina**). Eraitza horrek aukera emango luke MPIa duen paziente baten BOParen esanahia (hematiak soilik) PIIa duen paziente baten BOParen esanahiagatik bereizteko (hematiak eta PMNak). Halaber, erantzuna emango lioke hematien identifikazioak PI izateko arriskua 4 aldiz handitzeari.

Karrakatzeko bidezko zitologia esfoliatiboa teknika diagnostiko merkea, odolgabea, erraza eta erabilgarria da ahoko prozesu patologiko askotan (Acha et al., 2006). Patologia honetan ikusitako datu zitologiko nagusien sentikortasun eta espezifikotasunen tasek, tresna diagnostiko osagarritzat hartzeko aukera diezagukete, PIren diagnostiko goiztiarrerako eta hortz-inplanteak dituzten pazienteen kontrolerako oso baliagarria izan daitekeena.

#### 5.4. Emaitza mikologikoei dagokienez

*Candida spp.* ahoko mukosan maiz agertzen den onddo saprofitoa da. Hortaz, haren presentziak hainbat nahasmenduren faktore etiopatogeniko gisa, gaiztoak barne, antzinatik izan du interes handia (Aguirre, 2002). Gure ikerketa PIDun pazienteek *Candida spp.* duten aztertu duen lehena izan da, aho-barneko laginen (irakuzketa) eta fluido periinplantarioko laginen (paper-puntak) bilketaren bitartez, periinplantitisean duen rol patogenikoa ezagutzeko helburuarekin.

Irakuzketa bidez hartutako aho barruko laginetan *Candida spp.*-ren hazkundera lortu dugu aztertutako banako guztien % 27,95ean. Ehuneko hori ez dator bat EAEn antzeko biztanlerian egindako beste ikerketekin (% 48,50) (de la Torre et al., 2018). Haatik, desberdintasun hori antiseptikoen erabileragatik izan daiteke. Gure pazienteak hortz-implanteekin tratatuta zeuden eta aho bidezko higiene mantentze-protokolo espezifiko bat jarraitzen zuten, klorhexidina % 0,12-0,2ko irakuzketak barneratu zezakeena, hain zuzen ere (Lang et al., 2000). Gainera, kultibo gehienak sinpleak izan ziren, eta batez ere *C. parapsilosis*-i (% 26,70) eta *C. albicans*-i (% 24,40) zegozkien, klorhexidinako irakuzketekin ere lotuta egon litekeena ere bai.

Klorhexidina *C. albicans*-en aurkako efektu antifungikoa duen klorofenil bisbiguanida oso kationikoa da (Ellepola & Samaranayake, 2001) du. Propietate horrek gure azterketako pazienteengan izan duen presentzia txikiagoa baldintzatu zezakeen, erresistenteagoak izango liratekeen *Candidaren* beste andui batzuekin alderatuta, hala nola *C. parapsilosis*. Klorhexidina-molekula estuki lotzen da karga negatiboa duten gainazalekin, keratinozitoak eta zelula fungikoak adibidez, eta *C. albicans* hormaren zatiketa eta nukleoproteinen koagulazioa eragin ditzake, onddoaren hazkundera inhibituz (Audus et al., 1992; MacNeill et al., 1997).

Gure ikerketaren alderdi aipagarri bat *C. parapsilosis*-en prebalentzia handia izan da, bai kultibo sinple zein mistoetan. *C. parapsilosis* espeziea garrantzi klinikorik gabeko legami ez-patogeno gisa deskribatu zen lehen aldiz (Weems, 1992). Hala ere, gailu medikoen eta infekzio nosokomialen erabilerak haren isolamendua areagotu du azkenengo urteotan (Krcmery et al., 2002). *C. parapsilosis*-en faktore patogeniko bereizgarria gailu medikoen gainean biopelikulak osatzeko gaitasuna da, pseudohifak sortuz eta hormetako atxikidura proteinak adieraziz, beste *Candida* espezie batzuekin batera (Butler et al., 2009; Rossignol et al., 2009; Pammi et al., 2013; Pryszcz et al., 2013; Neale et al., 2018). Espezie honek ahaidetasun handia erakusten du osasun-gailuen materialei atxikitzeko: protesi erauzgarrien erretxinei, protesi gaineko egituren gainazal metalikoei edo hortz-inplanteen titanio-azalerari (De Bernardis et al., 1999; Kuhn et al., 2002; Pannanusorn et al., 2014; Trofa et al., 2008; Neji et al., 2017). Ildo horretan, hortz-inplantei dagokienez behintzat, antifungiko desberdinen erabilera proposatu da (azolak, ekinoandinak, polienak) *Candida spp.*-ko biopelikulen eraketa saihesteko (Imbert et al., 2018).

Gure azterketan ikusi dugun beste emaitza interesgarri bat KOTeko ahoko irakuzketalaginetan *Candida spp.*-ko presentziaren erlazio esanguratsua ezagutzea izan da, paziente horzgabei eta protesi hibrido edota sobredentaduren eramailei zegokiena (Kilic et al., 2014). KATeko pazienteetan lotura hori ez antzematea ezaugarri horiek dituzten banakoen kopuru txikiagoarengatik dela uste dugu. Bestalde, harreman horiek erakusten digute *Candidaren* aho barruko presentziak harreman estua izango lukeela errehabilitazio protesikoarekin, PIREkiko independentea izanik. Onddo horren atxikipena gainazal protetikoko mikroporositatearen araberakoa izango litzateke, *Candida* eta beste bakterioen (*S. sanguis*, *S. gordonii*, etab.) kolonizazioa ahalbidetuz eta, aldi berean, hura ezabatzea zailtzen duten kolonia mistoak eratuz (Ferreira et al., 2009).

Hortz-inplanteekin tratatu ez diren pazienteetan gertatzen den bezala, errehabilitazio protetikoko mota *Candidaren* aho-kolonizazioa errazten duen elementu garrantzitsua dela ondorioztatu dezakegu, hortz-inplanteak dituzten banakoetan.

Ildo peri-inplantarioa *Candida spp.*-ren kolonizaziorako nitxo egokia izan litekeen arren, gure azterketan PIrik gabeko pazienteen fluido peri-inplantarioaren laginen % 4,20k eta PIa duten pazienteen laginen % 10ek soilik izan zuten hazkunde fungikoa. Zifra horiek aurreko ikerketetan lortutakoen antzekoak dira (Albertini et al., 2015; Schwarz et al., 2015); baita Espainia mailan egindakoen parekoak ere (Canullo et al., 2015).

Mikroorganismo espezifikoek, *Candida spp.* barne, gailu medikoak (taupada-markagailuak, protesiak, hortz-inplanteak, etab.) koloniza ditzakete, eta atxikitako *biofilm* patogenoak eratu (Ramage et al., 2006). *Candida* titanioari atxikitzea bere azaleraren faktore desberdinen menpekoa da: zimurtasuna, materialaren energia askea, propietate kimikoak, etab. (Nakazato et al., 1989; Bürgers et al., 2010). Hortz-inplantearen azaleko zimurtasun handiagoak, osteointegrazio sendoagoa eta azkarragoa sustatzen du (Bürgers et al., 2010). Aitzitik, kolonizazio bakteriano eta fungikoa ere areagotu dezake (Quirynen et al. 2001; Park et al., 2003). Egoera horrek PIren tratamendu ez-kirurgikoa justifikatuko luke, inplantearen gainazala deskontaminatzeko eta leuntzeko (Estefanía-Fresco et al., 2019).

Gure azterlanean fluido peri-inplantarioaren laginetan identifikatutako *Candida* espezieak ahoko irakuzketa-laginetan lortutakoen modukoak izan dira (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*), beste azterlan batzuen emaitzekin bat etorritik (Bertone et al., 2016; Alrabiah et al., 2019; Alsahhaf et al., 2019). Maiztasun txikia izan arren, kultibo gehienek 50 CFUtik gorako hazkundea izan zuten.

Fluido periinplantarioko laginetan antzemandako *Candidaren* presentzia modu esanguratsuan lotu da detritus eta linfuzitoen behaketarekin, bai osasun-inplanteen zein PIdun implanteen hedatu zitologikoetan. Ahoko higie txarraren ondoriozko produktu bakteriano, epitelial mukoso, proteiko eta abarren metaketek (detritusa) nitxo periinplantarioan pilatuko lirateke, eta hazkunde fungikoa erraztuko lukete (Salerno et al., 2011). Era berean, hanturazko exudatu periinplantarioak, *Candidaren* legamiak are gehiago atxikituko lituzke gainazal periinplantarioan (Salerno et al., 2011).

Gure emaitzetan oinarrituta, *Candida* generoko onddoek PIko agerpenean zeregin patogeniko handirik ez dutela baieztatu dezakegu, behintzat hortz-inplanteen kontrolpean dauden ikertu ditugun pazienteetan. Hala ere, *Candida* ahoko agente mikrobiologikoa da eta elementu garrantzitsua izan daiteke zenbait kasutan, batez ere mikrobiota konplexuarekin duen harremana dela eta. Izan ere, *Candida* ehun periinplantarioan dauden beste periinplantopatogenoekin sinbiosian dago. Canullo et al.-ek (2015) aipatu zuten, interesgarria izango litzateke *Candida spp.*-ak PIren mikroorganismo patogeno nagusiekin duen lotura ezagutzea eta, horrekin batera, hanturazko erantzunaren mantentzean duen benetako eginkizuna jakitea.





## 6. ONDORIOAK

1. Aztertutako EAeko PIa diagnostikatutako pazienteek ez dute erakusten patologia hori duten beste populazio batzuetan aipatutakoen ezaugarri orokor desberdinik.
2. GBP1 eta BRINP3 polimorfismo genetikoaren presentzia PIa duten pazienteetan handiagoa dela antzeman dugu, hanturazko-erantzunaren edota hezur-birmoldaketaren alterazioekin lotuta egongo litzatekeena.
3. OPG, BMP4 eta FGF3 polimorfismo genetikoaren presentzia PIa duten pazienteetan handiagoa dela antzeman dugu, tabako-kontsumitzaileetan edota diabetes mellitusa duten banakoetan, hezur-birmoldaketaren alterazioekin lotuta egongo litzatekeena.
4. GBP1, BRINP3, OPG, BMP4 eta FGF3 polimorfismo genetikoaren presentziak ez du areagotzen PI garatzeko arriskua EAeko biztanlerian.
5. PIDun mukosa periinplantarioaren zitologia hedatuek detritus, zelula epitelial, mikrobio-metaketa, globulu-gorri eta polimorfonuklear kopuru nabarmen handiagoa erakusten dute, mukosa periinplantario osasuntsuarenek baino.
6. PIDun mukosa periinplantarioaren hedatu zitologikoetan mikrobiota konplexuaren presentzia gaixotasunaren larritasun handiagoarekin lotzen da.
7. Mukosa periinplantarioko hedatu zitologikoetan zelula epitelialak, mikrobio-metaketak, hematiak edo polimorfonuklearrak banaka agertzeak, PIa garatzeko arriskua areagotzen du. Aitzitik, linfuzitoen presentziak babesa ematen du.
8. Mukosa periinplantarioaren azterketa zitologikoak, diagnostiko-prozedura gisa, % 76,66ko batez besteko sentikortasuna izan du, eta % 73,33ko espezifikotasuna; beraz,

PIren diagnostiko goiztiarrerako eta hortz-inplanteak dituzten pazienteen kontrolerako baliagarria izan daitekeela uste dugu.

9. Ez dugu desberdintasun esanguratsurik ikusi PIa eta PIrik ez duten pazienteen artean *Candida spp.* presentziari dagokionez, bai aho-barrunbean zein fluido periinplantarioan.

10. Lotura esanguratsua antzeman dugu fluido periinplantarioko *Candida spp.* presentziaren eta hedatu zitologikoko detritus eta linfuzitoen behaketaren artean.

11. Ohiko gaixotasun honi buruzko azterketa gehiago egitea beharrezkoa da, gure emaitzak baieztatzeko eta haren etiopatogenia hobeto ezagutzeko; eta, bide batez, diagnostiko goiztiarra, terapeutika ona eta kontrol egokia egin ahal izateko.



## 7. BIBLIOGRAFIA

- Acha A, Ruesga MT, Rodríguez MJ, Martínez de Pancorbo MA, Aguirre JM. Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cáncer y precáncer oral. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10(2):95-102.
- Adell R, Lekholm U, Rockler B, Brånemark PI, Lindhe J, Eriksson B et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures:(I). A 3-year longitudinal prospective study. *Int J Oral Maxillofac*. 1986;15(1):39-52.
- Aguirre-Urizar JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*. 2002;19(1):17-21.
- Aguirre-Zorzano LA, Estefania-Fresco R, Telletxea O, Bravo M. Prevalence of peri-implant inflammatory disease in patients with a history of periodontal disease who receive supportive periodontal therapy. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(11):1338–1344.
- Ahrens M, Ankenbauer T, Schroder D, Hollnagel A, Mayer H, Gross G. Expression of human bone morphogenetic proteins-2 or -4 in murine mesenchymal progenitor C3H10T1/2 cells induces differentiation into distinct mesenchymal cell lineages. *DNA Cell Biol*. 1993;12(10):871–880.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001;2(8):675-680.
- Albertini M, López-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(8):937-941.

- Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh, T. Spontaneous progression of peri-implantitis at different types of implants. An experimental study in dogs. I: clinical and radiographic observations. *Clin Oral Implants Res.* 2008;19(10):997–1002.
- Albouy JP, Abrahamsson I, Persson LG, Berglundh T. Spontaneous progression of ligature induced peri-implantitis at implants with different surface characteristics. An experimental study in dogs II: histological observations. *Clin Oral Implant Res.* 2009;20(4):366–371.
- Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In Lang NP, Karring T. *Proceedings of the 1st European Workshop on Periodontology.* Quintessence (Chicago);1994:365.
- Albrektsson T, Canullo L, Cochran D, De Bruyn H. “Peri-Implantitis: A Complication of a Foreign Body or a Man-Made “Disease”. Facts and Fiction. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2016;18(4):840-849.
- Albouy JP, Abrahamsson I, Berglundh T. Spontaneous progression of experimental peri-implantitis at implants with different surface characteristics: an experimental study in dogs. *J Clin Periodontol.* 2012;39(2):182-187.
- Alcoforado GA, Rams TE, Feik D, Slots J. Microbial aspects of failing osseointegrated dental implants in humans. *J Parodontol.* 1991;10(1):11-18.
- Alhammedi SH, Burnside G, Milosevic A. Clinical outcomes of single implant supported crowns versus 3-unit implant-supported fixed dental prostheses in Dubai Health Authority: a retrospective study. *BMC Oral Health.* 2021;21(1):1-11.

- Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojaly SA, Abduljabbar T, Javed, F. Presence of *Candida* species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clin Implants Dent Relat Res*. 2019;21(4):781-785.
- Alsahhaf A, Al-Aali KA, Alshagroud RS, Alshiddi IF, Alrahlah A, Abduljabbar T, et al. Comparison of yeasts species in the subgingival oral biofilm of individuals with type 2 diabetes and peri-implantitis and individuals with peri-implantitis without diabetes. *J Periodontol*. 2019;90(12):1383–1389.
- Anderson HC, Hodges PT, Aguilera XM, Missana L, Moylan PE. Bone morphogenetic protein (BMP) localization in developing human and rat growth plate, metaphysis, epiphysis, and articular cartilage. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(11):1493-1502.
- Apse P, Ellen RP, Overall CM, Zarb GA. Microbiota and crevicular fluid collagenase activity in the osseointegrated dental implant sulcus: a comparison of sites in edentulous and partially edentulous patients. *J Perio Res*. 1989;24(2):96-105.
- Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trend Microbiol*. 2017;25(1):62-75.
- Araujo MG, Lindhe, J. Peri-implant health. *J Periodonol*. 2018;89(1):S249-S256.
- Arnaud-Dabernat S, Kritzik M, Kayali AG, Zhang YQ, Liu G, Ungles C, et al. FGFR3 is a negative regulator of the expansion of pancreatic epithelial cells. *Diabetes*. 2007;56(1):96-106.
- Asagiri M, & Takayanagi H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. *Bone*. 2007;40(2):251-264.

- Asbell Milton B. *Dentistry. A historical perspective: being a historical account of the history of dentistry from ancient times with emphasis upon the United States from the colonial to the present period.* Bryn Mawr PaDorrance & Co (Fort Myers) 1988:1-256.
- Audus KL, Tavakoli-Saberi MR, Zheng H, Boyce EN. Chlorhexidine effects on membrane lipid domains of human buccal epithelial cells. *J Dent Res.* 1992;71:1298-1303.
- Baires-Varguez L, Cruz-García A, Villa-Tanaka L, Sánchez-García S, Giatan-Cepeda LA, Sanchez-Nargas LO, et al. Comparison of a randomly amplified polymorphic DNA (REPD) analysis and ATD ID 32C system for identification of clinical isolates of different *Candida* species. *Rev Iberoam Micol.* 2007;24(2):148-151.
- Becker W, Becker BE, Newman MG, Nyman S. Clinical and microbiologic findings that may contribute to dental implant failure. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1990;5(1):1-17.
- Belibasakis GN. Microbiological and immuno-pathological aspects of peri-implant diseases. *Archi Oral Biol.* 2014;59(1):66-72.
- Berglundh T, Gislason O, Lekholm U, Sennerby L, Lindhe J. Histopathological observations of human periimplantitis lesions. *J Clin Periodontol.* 2004;31(5):341–347.
- Berglundh T, Lindhe J. Dimension of the periimplant mucosa: biological width revisited. *J Clin Periodontol.* 1996;23(10):971-973.
- Berglundh T, Zitzmann N, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol.* 2011;38:188–202.

- Bertone AM, Rosa AC, Nastri N, Santillán HD, Ariza Y, Iovannitti CA, et al. Genetic-relatedness of peri-implants and buccal *Candida albicans* isolates determined by RAPD-PCR. *Acta Odontol Lat*. 2016;29(3):197–200.
- Bilhan H, Sulun T, Erkose G, Kurt H, Erturan Z, Kutay O, et al. The role of *Candida albicans* hyphae and *Lactobacillus* in denture-related stomatitis. *Clin Oral Investig*. 2009;13(4):363-368.
- Borie E, Oliví DG, Orsi IA, Garlet K, Weber B, Beltrán V et al. Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(5):7922-7929.
- Bosshardt DD, Lang NP. The junctional epithelium: from health to disease. *J Dent Res*. 2005;84(1):9–20.
- Bowers RR, Lane MD. A role for bone morphogenetic protein-4 in adipocyte development. *Cell Cycle*. 2007;6(4):385–389.
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 2003;423(6937):337-342.
- Brånemark PI. Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg*. 1977;16:1-132
- Brånemark PI. Tissue-integrated prostheses. *Quintessence*. 1985;99-115.
- Bravo-Pérez M, Almerich-Silla JM, Canorea-Díaz E, Casals-Pedró E, Cortés-Martícorena FJ, Expósito-Delgado A, et al. Encuesta de Salud Oral en España. *RCOE* 2020;25:22-23.



- Bullon P, Fioroni M, Goteri G, Rubini C, Battino M. Immunohistochemical analysis of soft tissues in implants with healthy and peri-implantitis condition, and aggressive periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2004;15(5):553–559.
- Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010;6(6):2307-2313.
- Butler G, Rasmussen MD, Lin MF, Santos MA, Sakthikumar S, Munro CA, et al. Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight *Candida* genomes. *Nature.* 2009;459(7247):657–662.
- Campos MI, dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Early failure of dental implants and TNF-alpha (G-308A) gene polymorphism. *Implant Dent.* 2004;13(1):95-101.
- Campos MI, Godoy dos Santos MC, Trevilatto PC, Scarel-Caminaga RM, Bezerra FJ, Line SR. Interleukin-2 and interleukin-6 gene promoter polymorphisms, and early failure of dental implants. *Implant Dent.* 2005;14(4):391-396.
- Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Soldini C, Mazzocco F, Peñarrocha M, Covani, U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):426-434.
- Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Covani U, Rossetti PHO. Microbiologic and clinical findings of implants in healthy condition and with peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(4):834–842.

- Canullo L, Tallarico M, Radovanovic S, Delibasic B, Covani U, Rakic M. Distinguishing predictive profiles for patient-based risk assessment and diagnostics of plaque induced, surgically and prosthetically triggered peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(10):1243-1250.
- Capaldo CT, Beeman N, Hilgarth RS, Nava P, Louis NA, Naschberger E, et al. IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ -induced GBP-1 inhibits epithelial cell proliferation through suppression of  $\beta$ -catenin/TCF signaling. *Mucosal Immunol.* 2012;5(6):681-690.
- Capestany CA, Tribble GD, Maeda K, Demuth DR, Lamont RJ. Role of the Clp system in stress tolerance, biofilm formation, and intracellular invasion in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2008;190(4):1436–1446.
- Carlsson J. Presence of various types of non-hemolytic streptococci in dental plaque and in other sites of the oral cavity in man. *Odontol Revy.* 1967;18(1):55-74.
- Carlsson JH, Grahn GJ, Wikner S. Establishment of *Streptococcus sanguis* in the mouths of infants. *Arch Oral Biol.* 1970;15(12):1143-1148.
- Carr BR, Boggess WJ, Coburn JF, Rekawek P, Chuang SK, Panchal N et al. Does alcohol consumption protect against late dental implant failures?. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2021;131(6):631-637.
- Carraro JJ, Dizner B, Alonso C. Exfoliative cytology in inflammatory gingival lesions. *Rev Asoc Odon Arg.* 1965;53(11):374-376.
- Casado PL, Aguiar DP, Costa LC, Fonseca MA, Vieira TC, Alvim-Pereira CC et al. Different contribution of BRINP3 gene in chronic periodontitis and peri-implantitis: a cross-sectional study. *BMC Oral Health.* 2013;51(6):353-358.

- Casado PL, Pereira MC, Duarte ME, Granjeiro JM. History of chronic periodontitis is a high risk indicator for peri-implant disease. *Braz Dent J.* 2013;24(2):136–141.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—Introduction and key changes from the 1999 classification. *J Periodontol.* 2018;89:S1-S8.
- Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury AA, da Silva WJ, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofoul.* 2016;32(2):123–134.
- Cecilia EC, Myriam AK, María EL. Cytological analysis of the periodontal pocket in patients with aggressive periodontitis and chronic periodontitis. *Contemp Clin Den.* 2014;5(4):495-500.
- Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: Development, architecture, and drug resistance. *J. Bacteriol.* 2001;183(18):5385–5394.
- Chang M, Wennström JL. Soft tissue topography and dimensions lateral to single implant-supported restorations. A cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2013;24(5):556–562.
- Chang M, Wennström JL, Odman P, Andersson B. Implant supported single-tooth replacements compared to contralateral natural teeth. Crown and soft tissue dimensions. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(3):185–194.

- Charalampakis G, Leonhardt Å, Rabe P, Dahlén G. Clinical and microbiological characteristics of peri-implantitis cases: a retrospective multicentre study. *Clin Oral Impl Res.* 2012;23(9):1045-1054.
- Chattopadhyay T, Singh RR, Gupta S, Surolia A Bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) augments insulin sensitivity in mice with type II diabetes mellitus by potentiating PI3K/AKT pathway. *Biofactors.* 2017;43(2):195–209.
- Chen T, Hosogi Y, Nishikawa K, Abbey K, Fleischmann RD, Walling J, Duncan MJ. Comparative whole-genome analysis of virulent and avirulent strains of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 2004;186(16):5473–5479.
- Choi Y, Woo KM, Ko SH, Lee YJ, Park SJ, Kim HM, Kwon B, et al. Osteoclastogenesis is enhanced by activated B cells but suppressed by activated CD8(+) T cells. *Eur J Immunol.* 2001;31(7):2179–2188.
- Ciurea CN, Kosovski IB, Mare AD, Toma F, Pintea-Simon IA, Man A. Candida and Candidiasis—Opportunism Versus Pathogenicity: A Review of the Virulence Traits. *Microorganism.* 2020;8(6):857. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8060857>
- Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3(3):S131-S139.
- Cobo F, Rodríguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martínez L, Navarro-Marí JM. Candida prosthetic joint infection. A review of treatment methods. *J Bone Joint Inf.* 2017;2(2):114-121.

- Coelho RB, Gonçalves Junior R, Villas-Boas RDM, Bonato LL, Quinelato V, Pinheiro ADR et al. Haplotypes in BMP4 and FGF genes increase the risk of peri-implantitis. *Braz Dent J.* 2016;27(4):367-374.
- Costa FO, Takenaka-Martinez S, Cota LOO, Ferreira SD, Silva GL, Costa JEE. Peri-implant disease in subjects with and without preventive maintenance: a 5-year follow-up. *J Clin Periodontol.* 2012;39(2):173–181.
- Cosyn J, Christiaens V, Koningsveld V, Coucke PJ, De Coster P, De Paepe A et al. An Exploratory Case-Control Study on the Impact of IL-1 Gene Polymorphisms on Early Implant Failure. *Clin Implants Dent Rel Res.* 2016;18(2):234-240.
- Croucher PI, Shipman CM, Lippitt J, Perry M, Asosingh K, Hijzen A, et al. Osteoprotegerin inhibits the development of osteolytic bone disease in multiple myeloma. *Blood.* 2001;98(13):3534–3540.
- Cury PR, Horewicz VV, Ferrari DS, Brito R Jr, Sendyk WR, Duarte PM et al. Evaluation of the effect of tumor necrosis factor-alpha gene polymorphism on the risk of peri-implantitis: a case-control study. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2009;24(6):1101-1115.
- Cury PR, Joly JC, Freitas N, Sendyk WR, Nunes FD, de Araújo NS. Effect of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Polymorphism on Peri-Implant Bone Loss Following Prosthetic Reconstruction. *Implant Dent.* 2007;16(1):80-88.
- Czaja AJ. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol.* 2014;20(10):2515–2532.

- Dalago HR, Schuldt Filho G, Rodrigues MAP, Renvert S, Bianchini MA. Risk indicators for peri-implantitis. A cross-sectional study with 916 implants. *Clin Oral Implant Res.* 2017;28(2):144-150.
- Danser MM, van Winkelhoff AJ, van der Velden U. Periodontal bacteria colonizing oral mucous membranes in edentulous patients wearing dental implants. *J Periodontol.* 1997;68(3):209-216.
- Daubert DM, Weinstein BF, Bordin S, Leroux BG, Flemming TF. Prevalence and predictive factors for peri-implant disease and implant failure: a cross-sectional analysis. *J Periodontol.* 2015;86(3):337–347.
- Davies JE. Understanding peri-implant endosseous healing. *J Dent Educ* 2003;67(8):932–949.
- de Araujo Nobre M, Mano Azul A, Rocha E, Malo P. Risk factors of peri-implant pathology. *Eur J Oral Sci.* 2015;123(3):131–139.
- De Bernardis F, Mondello F, San Millan R, Ponton J, Cassone A. Biotyping and virulence properties of skin isolates of *Candida parapsilosis*. *J Clin Microbiol.* 1999;37(11):3481–3486.
- de Boever AL, De Boever JA. Early colonization of non-submerged dental implants in patients with a history of advanced aggressive periodontitis. *Clin Oral Implant Res.* 2006;17(1):8-17.
- de Brandao ML, Vettore MV, Vidigal Junior GM. Peri-implant bone loss in cement- and screw-retained prostheses: systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2013;40(3):287–295.

- DeCarlo AA, Jr, Windsor LJ, Bodden MK, Harber GJ, Birkedal-Hansen B, Birkedal-Hansen H. Activation and novel processing of matrix metalloproteinases by a thiol-proteinase from the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res*. 1997;76(6):1260–1270.
- de la Torre J, Quindós G, Marcos-Arias C, Marichalar-Mendia X, Gainza ML, Eraso E et al. Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(3):134-139.
- del Valle AE, López-Vicente J, Martínez-Conde R, Aguirre-Zorzano LA. Current understanding of genetic polymorphisms as biomarkers for risk of biological complications in implantology. *J Clin Exp Dent*. 2018;10(10):e1029- e1039.
- Dereka X, Mardas N, Chin S, Petrie A, Donos N. A systematic review on the association between genetic predisposition and dental implant biological complications *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(7):775–788.
- Derks J, Schaller D, Håkansson J, Wennström JL, Tomasi C, Berglundh T. Effectiveness of implant therapy analyzed in a Swedish population: prevalence of peri-implantitis. *J Dent Res*. 2016;95(1):43–49.
- Derks J, Schaller D, Hakansson J, Wennstrom JL, Tomasi C, Berglundh T. Peri-implantitis-onset and pattern of progression. *J Clin Periodontol*. 2016;43(4):383–388.
- Dinarello CA. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:519–550.

- Diniz-Freitas M, García-García A, Crespo-Abelleira A, Martins-Carneiro JL, Gándara-Rey JM. Applications of exfoliative cytology in the diagnosis of oral cancer. *Med Oral*. 2004;9(4):355-361.
- Dirschnabel AJ, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Bernardino JF, Rosa EA, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B(C-511T) polymorphism with dental implant loss and the clusterization phenomenon. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(11):1235-1241.
- Doetzer AD, Schlipf N, Alvim-Pereira F, Alvim-Pereira CC, Werneck R, Riess O et al. Lactotransferrin Gene (LTF) Polymorphisms and Dental Implant Loss: A Case-Control Association Study. *Clin Implant Dent Rel Res*. 2015;17:e550-e561.
- Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A. Invasion of endothelial and epithelial cells by strains of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;187(2):139–144.
- Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: A systematic review. *J Periodontol Res*. 2018;53(5):657-681.
- Driemel O, Kunkel M, Hullmann M, von Eggeling F, Müller-Richter U, Kosmehl H et al. Diagnosis of oral squamous cell carcinoma and its precursor lesions. *Journal Der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*. 2007;5(12):1095-1100.
- dos Santos MC, Campos MI, Souza AP, Scarel-Caminaga RM, Mazzonetto R, Line SR. Analysis of the transforming growth factor-beta 1 gene promoter polymorphisms in early osseointegrated implant failure. *Implant Dent*. 2004;13(3):262-269.



- Eick S, Pfister W. Efficacy of antibiotics against period-ontopathogenic bacteria within epithelial cells: an in vitro study. *J Periodontol.* 2004;75(10):1327–1334.
- Ellepola ANB, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis.* 2011;7(1):11-17.
- Endo H, Rees TD, Kuyama K, Matsue M, Yamamoto H. Use of oral exfoliative cytology to diagnose desquamative gingivitis: A pilot study. *Quintessence Int.* 2008;39(4):e152-e161.
- Eriksson AR, Albrektsson T, Albrektsson B. Heat caused by drilling cortical bone. Temperature measured in vivo in patients and animals. *Acta Orthop Scand.* 1984;55(6):629–631.
- Esfahanizadeh N, Daneshparvar N, Motallebi S, Akhondi N, Askarpour F, Davaie S. Do we need keratinized mucosa for a healthy peri-implant soft tissue? *Gen Dent.* 2016;64(4):51–55.
- Esposito M, Hirsch JM, Lekholm U, Thomsen P Biological factors contributing to failures of osseointegrated oral implants. (II). Etiopathogenesis. *Eur J Oral Sci.* 1998;106(1):721–764.
- Estefanía-Fresco R, García-de-la-Fuente AM, Egaña-Fernández-Valderrama A, Bravo M, Aguirre-Zorzano LA. One-year results of a nonsurgical treatment protocol for peri-implantitis. A retrospective case series. *Clin Oral Implant Res.* 2019;30(7):702-712.
- Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002585.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002585>

- Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Bürgin W, Brägger U, Buser D, Duf GW, Kornman KS. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for periimplant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implant Res.* 2003;14(1):10–17.
- Fernandes MS, Vaz P, Braga AC, Fernandes JCS, Figueiral MH. The role of IL-1 gene polymorphisms (IL1A, IL1B, and IL1RN) as a risk factor in unsuccessful implants retaining overdentures. *J Prosth Res.* 2017;61(4):439-449.
- Ferreira MA, Pereira-Cenci T, Rodrigues de Vasconcelos LM, Rodrigues-Garcia RC, Del Bel Cury AA. Efficacy of denture cleansers on denture liners contaminated with *Candida* species. *Clin Oral Investig.* 2009;13(2):237-242.
- Ferreira SD, Silva GL, Cortelli JR, Costa JE, Costa FO. Prevalence and risk variables for peri-implant disease in Brazilian subjects. *J Clin Periodontol.* 2006;33(12):929–935.
- Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2012;9(2):109-118.
- Florencio-Silva R, Sasso GRDS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Res Int.* 2015;15:421746. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>
- Forster F, Paster W, Supper V, Schatzlmaier P, Sunzenauer S, Ostler N, et al. Guanylate binding protein 1-mediated interaction of T cell antigen receptor signaling with the cytoskeleton. *J Immunol.* 2014;192(2):771–781.
- Fu XH, Meng FL, Hu Y, Zhou JQ. *Candida albicans*, a distinctive fungal model for cellular aging study. *Aging Cell.* 2008;7(5):746–757.

- Fürst MM, Salvi GE, Lang NP, Persson GR. Bacterial colonization immediately after installation on oral titanium implants. *Clin Oral Implant Res.* 2007;18(4):501-508.
- Gamper FB, Benic GI, Sanz-Martin I, Asgeirsson AG, Hämmerle CH, Thoma DS. Randomized controlled clinical trial comparing one-piece and two-piece dental implants supporting fixed and removable dental prostheses: 4-to 6-year observations. *Clin Oral Implant Res.* 2017;28(12):1553-1559.
- García-Delaney C, Sánchez-Garcés MÁ, Figueiredo R, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Clinical significance of interleukin-1 genotype in smoking patients as a predictor of peri-implantitis: A case-control study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2015;20(6):e737-e743.
- Genco RJ, Borgnakke WS. Risk factors for periodontal disease. *Periodontology* 2000. 2013;62(1):59-94.
- Gill GW. Papanicolaou Stain. Cytopreparation. In *Essentials in Cytopathology* 2013;12:143–189.
- Gobbato L, Avila-Ortiz G, Sohrabi K, Wang CW, Karimbux N. The effect of keratinized mucosa width on peri-implant health: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2013;28(6):1536–1545.
- Gobierno Vasco. Informe anual del desarrollo del Decreto 118/90 sobre asistencia dental a la población infantil de la C.A.P.V. Gobierno Vasco (Vitoria-Gasteiz), 2019.
- Goldstein BI, Kemp DE, Soczynska JK, McIntyre RS. Inflammation and the phenomenology, pathophysiology, comorbidity, and treatment of bipolar disorder: a systematic review of the literature. *J Clin Psych.* 2009;70(8):1078–1090.

- Gomes JA, Sartori IA, Able FB, de Oliveira Silva TS, do Nascimento C. Microbiological and clinical outcomes of fixed complete-arch mandibular prostheses supported by immediate implants in individuals with history of chronic periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(6):734–741.
- Gómez-Molero E, De-la-Pinta I, Fernández-Pereira J, Groß U, Weig M, Quindós G et al. *Candida parapsilosis* colony morphotype forecasts biofilm formation of clinical isolates. *J Fungi.* 2021;7(1):33. <https://doi.org/10.3390/jof7010033>
- Goulley J, Dahl U, Baeza N, Mishina Y, Edlund H. BMP4-BMPRI1A signaling in beta cells is required for and augments glucose-stimulated insulin secretion. *Cell Metab.* 2017;5(3):207–219.
- Graves DT, Cochran D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. *J Periodontol.* 2003;74(3):391-401.
- Graves DT, Valentin-Opran A, Delgado R. The potential role of platelet-derived growth factor as an autocrine or paracrine factor for human bone cells. *Connective Tissue Res.* 1989;23(2-3):209-218.
- Grayson R, Douglas CW, Heath J, Rawlinson A, Evans GS. Activation of human matrix metalloproteinase 2 by gingival crevicular fluid and *Porphyromonas gingivalis*. *J Clin Periodontol.* 2003;30(6):542–550.
- Greenfield EJ. Implantation of artificial crown and bridge abutments. *Int J Oral Implant.* 1991;7(2):63–68.
- Groeger S & Meyle J. Oral mucosal epithelial cells. *Front Immunol.* 2019;10:208. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00208>

- Gruica B, Wang HY, Lang NP, Buser D. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Implant Res.* 2004;15(4):393–400.
- Gualini F, Berglundh T. Immunohistochemical characteristics of inflammatory lesions at implants. *J Clin Periodontol.* 2003;30(1):14–18.
- Guimarães JM, Guimarães IC, Duarte ME, Vieira ME, Vieira T, Vianna VF, et al.. Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 gene are associated with fracture non-union. *J Orthop Res.* 2013;31(12):1971-1979.
- Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, Shah VO, Balakrishnan VS, Guzman NJ, Girndt M. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol Cjasn.* 2012;7(12):1938–1946.
- Gurul C, Kazazoglu E, Dabakoglu B, Korachi M. A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2011;26(5):955–960.
- Guven Y. Scientific basis of dentistry. *J Istanbul Uni Fac Dent.* 2017;51(3):64-71.
- Hamdy AAEMM, Ebrahim MAEM. The Effect of Interleukin-1 Allele 2 Genotype (IL-1a– 889 and IL-1b+ 3954) on the Individual's Susceptibility to Peri-Implantitis: Case-Control Study. *J Oral Implant.* 2011;37(3):325-334.
- Han G, Li F, Singh TP, Wolf P, Wang XJ. The pro-inflammatory role of TGFβ1: a paradox? *Int J Biol Sci.* 2012;8(2):228-235.

- Hayama FH, Motta AC, Silva Ade P, Migliari DA. Liquid-based preparations versus conventional cytology: specimen adequacy and diagnostic agreement in oral lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10(2):115-122.
- Haynes, K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol*. 2001;9(12):591–596.
- He K, Jian F, He T, Tang H, Huang B, Wei N. Analysis of the association of TNF- $\alpha$ , IL-1A, and IL-1B polymorphisms with peri-implantitis in a Chinese non-smoking population. *Clin Oral Inves*. 2020;24(2):693-699.
- Heitz-Mayfield LJ, Salvi GE. Peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2018;45(20):S237-S245.
- Heitz-Mayfield LJ, Schmid B, Weigel C. Does excessive occlusal load affect osseointegration? An experimental study in the dog. *Clin Oral Implant Res*. 2004;15(3):259–268.
- Herker E, Jungwirth H, Lehmann KA, Maldener C, Fröhlich KU, Wissing S et al. Chronological aging leads to apoptosis in yeast. *J Cell Biol*. 2004;164(4):501–507.
- Hoffmann A, Natoli G, Ghosh G. Transcriptional regulation via the NF- $\kappa$ B signaling module. *Oncogene*. 2006;25(51):6706–6716.
- Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, Lacey DL, Boyle WJ, Riggs BL. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*. 2000;15(1):2–12.
- Holland SM, Vinh D. Yeast infections--human genetics on the rise. *NEJM*. 2009;361(18):1798-1801.

- Honkala AT, Tailor D, Malhotra SV. Guanylate-binding protein 1: an emerging target in inflammation and cancer. *Front Immunol.* 2020;10:3139.  
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.0313>
- Hoyer LL, Cota E. *Candida albicans* agglutinin-like sequence (Als) family vignettes: A review of als protein structure and Function. *Front Microbiol.* 2016;7:280.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00280>
- Huang L, Chen R, Liu L, Zhou Y, Chen Z. Lactoferrin ameliorates pathological cardiac hypertrophy related to mitochondrial quality control in aged mice. *Food Funct.* 2020;12(16):7514-7526.
- Huang GT, Haake SK, Kim JW, Park NH. Differential expression of interleukin-8 and intercellular adhesion molecule-1 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* or *Porphyromonas gingivalis* infection. *Oral Microbiol Immunol.* 1998;13(5):301–309.
- Huang GT, Kim D, Lee JK, Kuramitsu HK, Haake SK. Interleukin-8 and intercellular adhesion molecule 1 regulation in oral epithelial cells by selected periodontal bacteria: multiple effects of *Porphyromonas gingivalis* via antagonistic mechanisms. *Infect Immun.* 2001;69(3):1364–1372.
- Huang GT, Zhang HB, Dang HN, Haake SK. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog.* 2004;37(6):303–312.
- Hultin M, Gustafsson A, Hallström H, Johansson LÅ, Ekfeldt A, Klinge B. Microbiological findings and host response in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implant Res.* 2012;13(4):349-358.

Imbert C, Rammaert B. What Could Be the Role of Antifungal Lock-Solutions? From Bench to Bedside. *Pathogens*. 2018;7(1):6.  
<https://doi.org/10.3390/pathogens7010006>.

Insua A, Monje A, Wang HL, Miron RJ. Basis of bone metabolism around dental implants during osseointegration and peri-implant bone loss. *J Biomed Mat Res*. 2017;105(7):2075-2089.

Ivanovski S, Lee R. Comparison of peri-implant and periodontal marginal soft tissues in health and disease. *Periodontol 2000*. 2018;76(1):116-130.

Jansson H, Hamberg K, De Bruyn Odont H, Odont GB. Clinical consequences of IL-1 genotype on early implant failures in patients under periodontal maintenance. *Clin Implants Dent Rel Res*. 2005;7(1):51-59.

Jaworska-Zaremba M, Mierzwińska-Nastalska E, Łomżyński L, Popko K, Wąsik M. Analysis of genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene in the implantoprosthesis group of patients – preliminary studies. *Centr Eur J Immunol*. 2008;33(2):74-77.

Jepsen S, Berglundh T, Genco R, Aass AM, Demirel K, Derks J, et al. Primary prevention of peri-implantitis: Managing peri-implant mucositis. *J Clin Periodontol*. 2015;42(16):S152-S157.

Ji S, Kim Y, Min BM, Han SH, Choi Y. Innate immune responses of gingival epithelial cells to nonperiodontopathic and periodontopathic bacteria. *J Periodontal Res*. 2007;42(6):503–510.



- Jolley KA, Wilson DJ, Kriz P, McVean G, Maiden MC. The influence of mutation, recombination, population history, and selection on patterns of genetic diversity in *Neisseria meningitidis*. *Mol Biol Evol*. 2005;22(3):562–569.
- Jones SJ. A special relationship between spherical and filamentous microorganisms in mature human dental plaque. *Archs Oral Biol*. 1972;17(3):613-616.
- Johnson JD, Chen R, Lenton PA, Zhang G, Hinrichs JE, Rudney JD. Persistence of extracrevicular bacterial reservoirs after treatment of aggressive periodontitis. *J Periodontol*. 2008;79(12):2305–2312.
- Ju HM, Ahn YW, Jeong SH, Jeon HM, Kim KH, Song BS, Ok SM. Characteristics of patients who perceive dental treatment as a cause of oral mucosal lesions. *J Oral Sci*. 2019;61(3):468–474.
- Junior RG, Pinheiro AR, Schoichet JJ, Nunes CHR, Gonçalves R, Bonato LL et al. MMP13, TIMP2 and TGFB3 gene polymorphisms in Brazilian subjects with chronic periodontitis and periimplantitis. *Braz Dent J*. 2016;27(2):128-134.
- Kadkhodazadeh M, Alizadeh Tabari Z, Ardakani MRT, Ebadian AR, Brook A. Analysis of osteoprotegerin (OPG) gene polymorphism in Iranian patients with chronic periodontitis and peri-implantitis. A cross-sectional study. *Eur J Oral Implant*. 2012;5(4):381-388.
- Kadkhodazadeh M1, Amid R, Ebadian AR, Shams E, Tamizi M. TRAF family member-associated NF-KB activator (TANK) gene polymorphism in chronic periodontitis and peri-implantitis patients. *J Long Term Eff Med Implant*. 2012;22(2):127-136.

- Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Amid R, Zarnegarnia P, Mollaverdi F, Aghamohammadi N. Natural resistance associated macrophage protein 1 gene polymorphism is associated with chronic periodontitis not peri-implantitis in an Iranian population: A cross sectional study. *Acta Med Iran.* 2016;54(5):323-329.
- Kadkhodazadeh M, Ebadian AR, Gholami GA, Khosravi A, Tabari ZA. Analysis of RANKL gene polymorphism (rs9533156 and rs2277438) in Iranian patients with chronic periodontitis and periimplantitis. *Arch Oral Biol.* 2013;58(5):530-536.
- Kamekura R, Nava P, Feng M, Quiros M, Nishio H, Weber DA et al. Inflammation-induced desmoglein-2 ectodomain shedding compromises the mucosal barrier. *Mol Biol Cell.* 2015;26(18):3165–3177.
- Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics* 2015;8(1):37. <https://doi.org/10.1186/s12920-015-0115-z>
- Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Bragger U, Hammerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(3):329–339.
- Kaufmann SH. Robert Koch, the Nobel Prize, and the ongoing threat of tuberculosis. *N Engl J Med.* 2005;353(23):2423-2426.
- Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006;169(3):987-998.

- Kawano H, Nakatani T, Mori T, Ueno S, Fukaya M, et al. (2004). Identification and characterization of novel developmentally regulated neural-specific proteins, BRINP family. *Mol Brain Res.* 2004;125(1-2):60-75.
- Kilic K, Koc AN, Tekinsen FF, Yildiz P, Kilic D, Zararsiz G, Kilic E. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in bar-and locator-retained overdentures. *J Implantol.* 2014;40(5):549–556.
- Kim BH, Shenoy AR, Kumar P, Das R, Tiwari S, MacMicking JD. A family of IFN- $\gamma$ -inducible 65-kD GTPases protects against bacterial infection. *Science.* 2011;332(6030):717–721.
- Knoke M, Bernhardt H. The first description of an oesophageal candidosis by Bernhard von Langenbeck in 1839. *Mycoses* 2006;49(4):283-287.
- Kocgozlu L, Elkaim R, Tenenbaum H, Werner S. Variable cell responses to *P. gingivalis* lipopolysaccharide. *J Dent Res.* 2009;88(8):741-745.
- Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. Prevalence of peri-implantitis related to severity of the disease with different degrees of bone loss. *J Periodontol.* 2010;81(2):231–238.
- Koldslund OC, Scheie AA, Aass AM. The association between selected risk indicators and severity of peri-implantitis using mixed model analyses. *J Clin Periodontol.* 2011;38(3):285-292.
- Kong YY, Boyle WJ, Penninger JM: Osteoprotegerin ligand: a common link between osteoclastogenesis, lymph node formation and lymphocyte development. *Immunol Cell Biol.* 1999;77(2):188–193.

- Kong YY, Feige U, Sarosi I, Bolon B, Tafuri A, Morony S, et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*. 1999;402(6759):304–309.
- Konttinen YT, Lappalainen R, Laine P, Kitti U, Santavirta S, Teronen O. Immunohistochemical evaluation of inflammatory mediators in failing implants. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2006;26(2):135–141.
- Koss L. *Diagnostic Cytology*. JB Lippincott Co (Philadelphia).1961;15.
- Kordbacheh Changi K, Finkelstein J, Papapanou PN. Peri-implantitis prevalence, incidence rate, and risk factors: A study of electronic health records at a US dental school. *Clin Oral Implant Res*. 2019;30(4):306-314.
- Kozlovsky A, Tal H, Laufer BZ. Impact of implant overloading on the peri-implant bone in inflamed and non-inflamed peri-implant mucosa. *Clin Oral Implant Res*. 2007;18(5):601–610.
- Krcmery V, Barnes AJ. Non-albicans *Candida* spp. causing fungaemia: Pathogenicity and antifungal resistance. *J Hosp Infect*. 2002;50(4):243–260.
- Kuhn DM, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infect Immun*. 2002;70(2):878–888.
- Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. *J Immunol*. 1990;144(11):4226-4230.

- Lachmann S, Kimmerle-Müller E, Axmann D, Scheideler L, Weber H, Haas R. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A-889 and IL-1B+ 3954 genotype: a cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. *Clin Oral Implant Res.* 2007;18(2):212–223.
- Ladeira-Casado P, Villas-Boas R, de Mello W, Leite Duarte ME, Mauro Granjeiro J. Peri-implant disease and chronic periodontitis: is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a Brazilian population? *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2013; 28(1):35-43.
- Ladwein C, Schmelzeisen R, Nelson K, Fluegge TV, Fretwurst T. Is the presence of keratinized mucosa associated with periimplant tissue health? A clinical cross-sectional analysis. *Int J Implant Dent.* 2015;1(1):11. <https://doi.org/10.1186/s40729-015-0009-z>.
- Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Setien-Olarrá A, Aguirre-Urizar JM, Marichalar-Mendia X. Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis. *Int J Implant Dent.* 2022;8(1):1-9.
- Laine ML, Leonhardt Å, Roos-Jansåker AM, Peña AS, Van Winkelhof AJ, Winkel EG, Renvert S. IL-1RN gene polymorphism is associated with periimplantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(4):380–385.
- Lamont RJ, Chan A, Belton CM, Izutsu KT, Vasel D, Weinberg A. *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun.* 1995;63(10):3878–3885.
- Landegren U, Nilsson M, Kwok PY. Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res.* 1998;8(8):769–776.

- Lang NP, Berglundh T. Working Group 4 of the Seventh European Workshop on Periodontology. Periimplant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol*. 2011;38(11):178-181.
- Lang NP, Wilson TG, Corbet EF. Biological complications with dental implants: their prevention, diagnosis and treatment Note. *Clin Oral Implant Res*. 2000;11(1):146-155.
- Lange D. Comparative histologic and cytologic studies on the human gingival marginal tissue. *Dtsch Zahnarztl Z*. 1965;20:1035-1047.
- Lancy Jr P, Appelbaum B, Holt SC, Rosan B Quantitative in vitro assay for “corncob” formation. *Inf Inmun*. 1980;29(2):663-670.
- Lange D. Vergleichende Histologische und Zytologische Untersuchungen am Menschlichen Gingivalsaum. *Deutsch. Zahnartzl. Ztschrift*. 1967;20:67.
- Lappin DF, Sherrabeh S, Jenkins WM, Macpherson LM. Effect of smoking on serum RANKL and OPG in sex, age and clinically matched supportive-therapy periodontitis patients. *J Clin Periodontol*. 2007;34(4):271-277.
- Lauren Bach JM, Epstein JB. Treatment strategies for oropharyngeal candidiasis. *Expert Opin Pharmacother*. 2009;10(9):1413–1421.
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2017;62:1-12.
- Lekholm U, Adell R, Lindhe J, Brånemark PI, Eriksson B, Rockler B et al. Marginal tissue reactions at osseointegrated titanium fixtures:(II) A cross-sectional retrospective study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1986;15(1):53-61.

- Leonhardt Å, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(5):339–345.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(3):S140-S146.
- Lin YH, Huang P, Lu X, Guan DH, Man Y, Wei N, Gong P. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2340–2344.
- Lin SJ, Austriaco N. Aging and cell death in the other yeasts, *Schizosaccharomyces pombe* and *Candida albicans*. *FEMS Yeast Res.* 2014;14(1):119–135.
- Lin GH, Chan HL, Wang HL. The significance of keratinized mucosa on implant health: a systematic review. *J Periodontol.* 2013;84(12):1755–1767.
- Lin YH, Huang P, Lu X, Guan DH, Man Y, Wei N, Gong P. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2340–2344.
- Lindahl B, Toss H, Siegbahn A, Venge P Wallentin L. Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease. *New Engl J Med.* 2000;343(16):1139–1147.
- Lindhe J, Meyle J, Group DoO WoP. Peri-implant diseases: consensus report of the Sixth European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):282–285.

- Lindquist LW, Carlsson GE, Jemt T. A prospective 15-year follow-up study of mandibular fixed prostheses supported by osseointegrated implants. Clinical results and marginal bone loss. *Clin Oral Implant Res.* 1996;7(4):329–336.
- Lionakis MS, Netea MG. Candida and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog.* 2013;9(1):e1003079.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003079>
- Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol* 1999;70(4):431-437.
- Listgarten MA, Mayo H, Amsterdam M. Ultrastructure of the attachment device between coccal and filamentous microorganisms in “corn cob” formations of dental plaque. *Archs Oral Biol.* 1973;18(5):651-675.
- Liu D, Xu JK, Figliomeni L, Pavlos NJ, Rogers M, Tan A, et al. Expression of RANKL and OPG mRNA in periodontal disease: possible involvement in bone destruction. *Int J Mol Med.* 2002;11(1):17–22.
- Lucchese A, Scivetti M, Giuliani M, Lajolo C, Serpico R, Favia G. Cellular populations of periimplant tissues: cytological analysis with sulcular microbrushing. *Implant Dent.* 2014;23(1):98-102.
- Lukas JR, Pastor RF. Activity-Induced Patterns of Dental Abrasion in Prehistoric Pakistan: Evidence From Mehrgarh and Harappa. *Am J Phys Anthropol.* 1988;76(3):377–398.



- McCourtie J, MacFarlane TW, Samaranayake LP. A comparison of the effects of chlorhexidine gluconate, amphotericin B and nystatin on the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *J Antimicrob Chemother.* 1986;17(5):575–583.
- MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*: an in vitro study. *J Clin Periodontol.* 1997;24(10):753-760.
- Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling osteoblast differentiation. *Gene*; 2003;316:23-32.
- Mark HB, Roberts SP. *The Merck Manual of Diagnosis and Therapy* (18 Edition). Merck Sharp & Dohme Corp (Kenilworth), 2016.
- Marchetti A. Biographic and personal recollections of George Papanicolaou. *Obst Gynec Survey.* 1969;24(7):680-684.
- Marrone A, Lasserre J, Bercy P, Brex MC. Prevalence and risk factors for peri-implant disease in Belgian adults. *Clin Oral Implant Res.* 2013;24(8):934-940.
- Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiol.* 2003;149(2):279–294.
- Massey HM, Flanagan AM. Human osteoclasts derive from CD14-positive monocytes. *Br J Haematol.* 1999;106(1):167-170.
- Máximo MB, de Mendonca AC, Alves JF, Cortelli SC, Peruzzo DC, Duarte PM. Peri-implant diseases may be associated with increased time loading and generalized periodontal bone loss: preliminary results. *J Oral Implantol.* 2008;34(5):268–273.

- Mba IE, Nweze EI. Mechanism of Candida pathogenesis: revisiting the vital drivers. *Eur J Clin Microbiol Inf Dis*. 2020;39(10):1797–1819.
- Medzhitov R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*. 2010;140(6):771-776.
- Melo RF, Lopes BM, Shibli JA, Marcantonio Junior E, Marcantonio RAC, Galli GMT. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 expression and gene polymorphisms in subjects with peri-implant disease. *Clin Implants Dent Relat Res*. 2012;14(6):905–914.
- Mencio F, De Angelis F, Papi P, Rosella D, Pompa G, Di Carlo S. A randomized clinical trial about presence of pathogenic microflora and risk of peri-implantitis: comparison of two different types of implant-abutment connections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21(7):1443–1451.
- Michalowicz BS, Diehl SR, Gunsolley JC, Sparks BS, Brooks CN, Koertge TE, Schenkein HA. Evidence of a substantial genetic basis for risk of adult periodontitis. *J Periodontol*. 2000;71(11):1699-1707.
- Miller AH, Maletic V, Raison CL. Inflammation and Its Discontents: The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Major Depression. *Biol Psych*. 2009;65(9):732–741.
- Mogensen TH. Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin Microbiol Rec*. 2009;22(2):240-273.
- Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res*. 2004;83(2):166–169.

- Molero G, Diez-Orejas R, Navarro-Garcia F, Monteoliva L, Pla J, Gil C et al. C. *Candida albicans*: Genetics, dimorphism and pathogenicity. *Int Microbiol.* 1998;1(12):95–106.
- Mombelli A, Müller N, Cionca N. The epidemiology of peri-implantitis. *Clin Oral Implant Res.* 2012;23(6):67-76.
- Monje A, Wang HL, Nart J. Association of preventive maintenance therapy compliance and peri-implant diseases: a cross-sectional study. *J Periodontol.* 2017;88(10):1030–1041.
- Montes CC, Alvim-Pereira F, De Castilhos BB, Sakurai MLL, Olandoski M, Trevilatto PC. Analysis of the association of IL1B (C+ 3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(2):208-217.
- Moonen CG, de Vries TJ, Rijkschroeff P, Poubelle PE, Nicu EA, Loos BG. The possible role of neutrophils in the induction of osteoclastogenesis. *J Immunol Res.* 2019; 2019:8672604. <https://doi.org/10.1155/2019/8672604>
- Moralis A, Kunkel M, Reichert TE, Kosmehl H, Driemel O. Identification of a recurrent oral squamous cell carcinoma by brush cytology. *Mund-, Kiefer-und Gesichtschirurgie: MKG.* 2007;11(6):355-358.
- Moyes DL, Wilson D, Richardson JP, Mogavero S, Tang SX, Wernecke J et al. Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. *Nature.* 2016;532(7597):64–68.
- Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;67(3):400–428.

- Nakazato G, Tsuchiya H, Sato M, Yamauchi M. In vivo plaque formation on implant materials. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 1989;4(4):321–326.
- Nakou M, Mikx FHM, Oosterwaal PJM, Kruijssen JCWM. Early microbial colonization of permucosal implants in edentulous patients. *J Dent Res.* 1987;66(11):1654-1657.
- Naot D, Grey A, Reid IR, Cornish J. Lactoferrin—a novel bone growth factor. *Clin Med Res.* 2005;3(2):93-101.
- Neale MN, Glass KA, Longley SJ, Kim DJ, Laforce-Nesbitt SS, Wortzel JD et al. Role of the inducible adhesin CpAls7 in binding of *Candida parapsilosis* to the extracellular matrix under fluid shear. *Inf Immun.* 2018;86(4):e00892-e00917.
- Neji S, Hadrich I, Trabelsi H, Abbes S, Cheikhrouhou F, Sellami H, et al. Virulence factors, antifungal susceptibility and molecular mechanisms of azole resistance among *Candida parapsilosis* complex isolates recovered from clinical specimens. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):67. <https://doi.org/10.1186/s12929-017-0376-2>
- Olmedo DG, Nalli G, Verdú S, Paparella ML, Cabrini R. Exfoliative Cytology and Titanium Dental Implants: A Pilot Study. *J Periodontol.* 2013;84(1):78-83.
- Osborn JF, Newesely H. Dynamic aspects of the implantbone interface. In: Heimke G, ed. *Dental implants: materials and systems.* München: Carl Hanser Verlag, 1980:111-123.
- Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis. *Front Immunol* 2014;5:48. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>

- Oxilia G, Peresani M, Romandini M, Matteucci C, Spiteri CD, Henry AG, Boscatto P. Earliest evidence of dental caries manipulation in the Late Upper Palaeolithic. *Sci Rep.* 2015;5(1):1-10.
- Padial-Molina M, López-Martínez J, O'Valle F, Galindo-Moreno P. Microbial profiles and detection techniques in peri-implant diseases: a systematic review. *J Oral Maxillofac Res.* 2016;7(3):e10. <https://doi.org/10.5037/jomr.2016.7310>
- Pammi M, Holland L, Butler G, Gacser A, Bliss J.M. *Candida parapsilosis* is a significant neonatal pathogen: A systematic review and meta-analysis. *Pediatr Infect Dis J.* 2013;32(5):e206–e216.
- Pannanusorn S, Ramirez-Zavala B, Lunsdorf H, Agerberth B, Morschhauser J, Romling U. Characterization of biofilm formation and the role of BCR1 in clinical isolates of *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell.* 2014;13(4):438–451.
- Park SE, Periathamby AR, Loza JC. Effect of surface-charged poly (methyl methacrylate) on the adhesion of *Candida albicans* 1. *J Prosthodont* 2003;12(4), 249-254.
- Parpaiola A, Cecchinato D, Toia M, Bressan E, Speroni S, Lindhe J. Dimensions of the healthy gingiva and peri-implant mucosa. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(6):657–662.
- Patel ZS, Young S, Tabata Y, Jansen JA, Wong ME, Mikos AG. Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model. *Bone.* 2008;43:(5)931-940.

- Patton LL, Epstein JB, Kerr AR. Técnicas adyuvantes en la exploración del cáncer oral y diagnóstico de lesiones. Una revisión sistemática de la literatura. *J Am Dent Assoc.* 2008;3(5):234-244.
- Pauk M, Bordukalo-Niksic T, Brkljacic J, Paralkar VM, Brault AL, Dumic-Cule I, et al. A novel role of bone morphogenetic protein 6 (BMP6) in glucose homeostasis. *Acta Diabetol.* 2019;56(3):365–371.
- Peñarrocha-Oltra D, Rossetti PH, Covani U, Galluccio F, Canullo L. Microbial leakage at the implant-abutment connection due to implant insertion maneuvers: cross-sectional study 5 years postloading in healthy patients. *J Oral Implantol.* 2015;41(6):e292–e296.
- Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Care JM. Development of Candida associated denture stomatitis: new insights. *J Appl Oral Sci.* 2008;16(2):86–94.
- Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2014;16(6):783-793.
- Petersen PE. The World Oral Health Report 2003: continuous improvement of oral health in the 21st century—the approach of the WHO Global Oral Health Programme. *Comm Dent Oral Epid.* 2003;31(1):3-24.
- Petkovic-Curcin A, Zeljic K, Cikota-Aleksic B, Dakovic D, Tatic Z, Magic Z. Association of cytokine gene polymorphism with peri-implantitis risk. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2017;32(5):e241–e248.
- Perera N, Ritchie RH, Tate M. The Role of Bone Morphogenetic Proteins in Diabetic Complications. *ACS Pharmacol Translat Sci.* 2019;3(1):11-20.

- Phillips AJ, Crowe JD, Ramsdale M. Ras pathway signaling accelerates programmed cell death in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(3):726–731.
- Polymeri A, Loos BG, Aronovich S, Steigmann L, Inglehart MR. Risk factors, diagnosis, and treatment of peri-implantitis: A cross-cultural comparison of US and European periodontists' considerations. *J Periodontol*. 2022;93(4):481-492.
- Pontoriero R, Tonelli MP, Carnevale G, Mombelli A, Nyman SR, Lang NP. Experimentally induced peri-implant mucositis. A clinical study in humans. *Clin Oral Implants Res*. 1994;5(4):254-259.
- Potempa J, Sroka A, Imamura T, Travis J. Gingipains, the major cysteine proteinases and virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*: structure, function and assembly of multidomain protein complexes. *Curr Protein Pept Sci*. 2003;4(6):397–407.
- Potocki L, Kuna E, Filip K, Kasprzyk B, Lewinska A, Wnuk M. Activation of transposable elements and genetic instability during long-term culture of the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Biogerontol*. 2019;20(4):457–474.
- Pryszcz LP, Nemeth T, Gacser A, Gabaldon T. Unexpected genomic variability in clinical and environmental strains of the pathogenic yeast *Candida parapsilosis*. *Genome Biol Evol*. 2013;5(12):2382–2392.
- Quirynen M, van der Mei HC, Bollen CM, Schotte A, Marechal M, Doornbusch GI, et al. An in vivo study of the influence of the surface roughness of implants on the microbiology of supra- and subgingival plaque. *J Dent Res*. 1993;72(9):1304–1309.

- Quirynen M, Vogels R, Peeters W, van Steenberghe D, Naert I, Haffajee A. Dynamics of initial subgingival colonization of ‘pristine’ peri-implant pockets. *Clin Oral Implant Res.* 2006;17(1):25–37.
- Rakic M, Petkovic-Curcin A, Struillou X, Matic S, Stamatovic N, Vojvodic D. CD14 and TNF $\alpha$  single nucleotide polymorphisms are candidates for genetic biomarkers of peri-implantitis. *Clin Oral Inv.* 2015;19(4):791-801.
- Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL. Candida biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yesat Tes.* 2006;6(7):979-986.
- Ramesh BL, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Devine A, Prince RL. Bone mass effects of a BMP4 gene polymorphism in postmenopausal women. *Bone.* 2005;36(3):555-561.
- Rams TE, Link CC. Microbiology of failing dental implants in humans: electron microscopic observations. *Oral Implantol.* 1983;11(1):93-100.
- Rams TE, Roberts TW, Tatum H Jr, Keyes PH. The subgingival microbial flora associated with human dental implants. *J Prosthet Dent.* 1984;51(4):529-534.
- Reis MBL, Arid J, Flores EKB, Cruz GV, Marañón-Vásquez GA, Souza LKFD et al. Association between Genetic Polymorphisms in RANK, RANKL and OPG and Peri-Implant Diseases in Patients from the Amazon Region. *Braz Dent J.* 2020;31(1):63-68.
- Renvert S, Aghazadeh A, Hallstrom H, Persson GR. Factors related to peri-implantitis— a retrospective study. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(4):522–529.



- Renvert S, Roos-Jansåker AM, Claffey N. Non-surgical treatment of periimplant mucositis and peri-implantitis: a literature review. *J Clin Periodontol*. 2008;35(8):305–315.
- Renvert S, Quirynen M. Risk indicators for peri-implantitis. A narrative review. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(11):15-44.
- Ribeiro R, Melo R, Tortamano Neto P, Vajgel A, Souza PR et al. Polymorphisms of IL-10 (-1082) and RANKL (-438) Genes and the Failure of Dental Implants. *Int J Dent*. 2017;2017:3901368. <https://doi.org/10.1155/2017/3901368>
- Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol*. 2011;187(9):4835–4843.
- Riegel A, Maurer T, Prior B, Stegmaier S, Heppert V, Wagner C, et al. Human polymorphonuclear neutrophils express RANK and are activated by its ligand, RANKL. *Eur J Immunol*. 2012;42(4):975-981.
- Ring Malvin E. *Dentistry: an illustrated history*. Abradale Press (Nueva York), 1985.
- Rinke S, Ohl S, Ziebolz D, Lange K, Eickholz P. Prevalence of periimplant disease in partially edentulous patients: a practice-based crosssectional study. *Clin Oral Implants Res*. 2011;22(8):826–833.
- Ritz, H. L. 1967. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Arch. Oral Biol*. 1956;12(12):1561-1568.

- Robinson K, Loughlin MF, Potter R, Jenks PJ. Host adaptation and immune modulation are mediated by homologous recombination in *Helicobacter pylori*. *J Infect Dis.* 2005;191(4):579–587.
- Roccuzzo M, Bonino F, Aglietta M, Dalmaso P. Ten-year results of a three arms prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 2: clinical results. *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(4):389–395.
- Roccuzzo M, De Angelis N, Bonino L, Aglietta M. Ten-year results of a three-arm prospective cohort study on implants in periodontally compromised patients. Part 1: implant loss and radiographic bone loss. *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(5):490–496.
- Roccuzzo M, Grasso G, Dalmaso P. Keratinized mucosa around implants in partially edentulous posterior mandible: 10-year results of a prospective comparative study. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(4):491–496.
- Rodrigo D, Sanz-Sánchez I, Figüero E, Llodrá JC, Bravo M, Caffesse RG, et al. Prevalence and risk indicators of peri-implant diseases in Spain. *J Clin Periodontol.* 2018;45(12):1510-1520.
- Rogers MA, Figliomeni L, Baluchova K, Tan AE, Davies G, Henry PJ et al. Do interleukin-1 polymorphisms predict the development of periodontitis or the success of dental implants?. *J Periodontal Res.* 2002;37(1):37-41.
- Rokn A, Aslroosta H, Akbari S, Najafi H, Zayeri F, Hashemi K. Prevalence of peri-implantitis in patients not participating in well-designed supportive periodontal treatments: a cross-sectional study. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(3):314–319.

- Romeo O, Criseo G. First molecular method for discriminating between *Candida africana*, *Candida albicans*, and *Candida dubliniensis* by using *hwp1* gene. *Diagn Microbiol Inf Dis*. 2008;62(2):230-233.
- Roos-Jansaker AM, Renvert H, Lindahl C, Renvert S. Nine- to fourteen-year follow-up of implant treatment. Part III: factors associated with peri-implant lesions. *J Clin Periodontol*. 2006;33(4):296–301.
- Rosa EAR, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, da Silva WJ, Yau JYY, et al. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. *J Med Microbiol*. 2008;57(10):1277–1281.
- Rosen P, Clem D, Cochran D, Froum S, McAllister B, Renvert S et al. Peri-implant mucositis and periimplantitis: A current understanding of their diagnoses and clinical implications. *J Periodontol*. 2013;84(4):436-443.
- Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res*. 1991;2(3):135-144.
- Rossignol T, Ding C, Guida A, d'Enfert C, Higgins DG, Butler G. Correlation between biofilm formation and the hypoxic response in *Candida parapsilosis*. *Eukaryot Cell*. 2009;8(4):550–559.
- Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SFG, dos Santos JD, de Barros PP, de Azevedo Prata MC et al. Competitive Interactions between *C. albicans*, *C. glabrata* and *C. krusei* during biofilm formation and development of experimental candidiasis. *PLoS ONE*. 2015;10(7):e0131700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131700>

- Rudney JD, Chen R. The vital status of human buccal epithelial cells and the bacteria associated with them. *Arch Oral Biol.* 2006;51(4):291–298.
- Rudney JD, Chen R, Sedgewick GJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Tannerella forsythensis* are components of a polymicrobial intracellular flora within human buccal cells. *J Dent Res.* 2005;84(1):59–63.
- Rusu M, Carlan M, Scantei V, Socolovschi M Some aspects of oral exfoliative cytology in marginal periodontal disease. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1973;16(1):61-80.
- Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Milillo L, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(2):e139-e143.
- Salvi GE, Fürst MM, Lang NP, Persson G. One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implants and adjacent teeth. *Clin Oral Impl Res.* 2009;19(3):242-248.
- Saki Y, Calonius PEB, Sohlberg F. Cytological Atypia in Epithelial Cells of Saliva and Gingival Pockets in Relation to Inflammatory Processes of the Mouth. *Suon. Hammaslaak. Toim.* 1960;56:309.
- Sanz M, Alandez J, Lazaro P, Calvo JL, Quirynen M, van Steenberghe D. Histopathologic characteristics of peri-implant soft tissues in Branemark implants with 2 distinct clinical and radiological patterns. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(3):128–134.

- Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2008;62(1):10–24.
- Saumann A. Los orígenes del Papanicolaou. *Rev Chil Obst Ginecol.* 1992;57(6):461-463.
- Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses.* 2005;48(6):365–377.
- Schlecht LM, Peters BM, Krom BP, Freiberg JA, Hansch GM, Filler SG et al. Systemic *Staphylococcus aureus* infection mediated by *Candida albicans* hyphal invasion of mucosal tissue. *Microbiol.* 2015;161(1):168–181.
- Schulz TJ, Tseng YH Emerging role of bone morphogenetic proteins in adipogenesis and energy metabolism. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2019;20(5–6):523–531.
- Schwarz F, Becker K, Sahm N, Horstkemper T, Rousi K, Becker J. The prevalence of peri-implant diseases for two-piece implants with an internal tube-in-tube connection: a cross-sectional analysis of 512 implants. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(1):24–28.
- Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent.* 2015;1(1):1-9.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):S246-S266.
- Schwarz F, Hegewald A, Becker J. Impact of implant-abutment connection and positioning of the machined collar/microgap on crestal bone level changes: a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2014;25(4):417–425.

- Schwarz F, Herten M, Sager M, Bieling K, Sculean A, Becker J. Comparison of naturally occurring and ligature-induced peri-implantitis bone defects in humans and dogs. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(2):161–170.
- Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6(12):1191–1197.
- Serino G, Strom C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20(2):169–174.
- Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Smoking and the risk of peri-implantitis. A systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Implant Res.* 2015;26(4):e62-e67.
- Sheets SM, Potempa J, Travis J, Casiano CA, Fletcher HM. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* W83 induce cell adhesion molecule cleavage and apoptosis in endothelial cells. *Infect Immun.* 2005;73(3):1543–1552.
- Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, et al. Biofilm-forming capability of highly virulent, multidrug-resistant *Candida auris*. *Emerg Infect Dis.* 2007;23(2):328–331.
- Shibli JA, Martins MC, Lotufo RFM, Marcantonio Jr E. Microbiologic and radiographic analysis of ligature-induced peri-implantitis with different dental implant surfaces. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2003;18(3):383-90.
- Shimono M, Ishikawa T, Enokiya Y, Muramatsu T, Matsuzaka KI et al. Biological characteristics of the junctional epithelium. *Microscopy.* 2003;52(6):627-639.

- Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):423–429.
- Shlipak MG, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, Furberg CD, Psaty BM. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation.* 2003;107(1):87–92.
- Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2011;19(5):241–247.
- Singh DK, Németh T, Papp A, Tóth R, Lukácsi S, Heidingsfeld O et al. Functional characterization of secreted aspartyl proteases in *Candida parapsilosis*. *mSphere.* 2019;4(4):e00484-e00519.
- Smith A, Krishnan L, Stein LD. International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Genome Res.* 2005;15(11):1592–1593.
- Smith PW, Watkins K, Hewlett A. Infection control through the ages. *A J Inf Control.* 2012;40(1):35-42.
- Sokos D, Everts V, De Vries TJ. Role of periodontal ligament fibroblasts in osteoclastogenesis: a review. *J Perio Res.* 2015;50(2):152-159.
- Sørensen MG, Henriksen K, Schaller S, Henriksen DB, Nielsen FC, Dziegiel MH et al. Characterization of osteoclasts derived from CD14<sup>+</sup> monocytes isolated from peripheral blood. *J Bone Min Met.* 2007;25(1):36-45.

- Souza PP, Lerner UH. The role of cytokines in inflammatory bone loss. *Immunol Invest.* 2013;42(7):555-622.
- Souza AB, Tormena M, Matarazzo F, Araujo MG. The influence of peri-implant keratinized mucosa on brushing discomfort and peri-implant tissue health. *Clin Oral Implants Res.* 2016;27(6):650–655.
- Sotorra-Figuerola D, Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Parra-Pérez C, Aguirre-Urizar JM. Histopathological analysis of biopsies of “peri-implant inflammatory lesions.” Everything is not what it seems. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2020;22(3):366-372.
- Sridhar S, Abidi Z, Wilson TG Jr. In vitro evaluation of the effects of multiple oral factors on dental implants surfaces. *J Oral Implantol.* 2016;42(3):248–257.
- Stahl SS. The use of oral exfoliative cytology in evaluating periodontal health. *J Periodontol.* 1967;38(6P2):736-740.
- Stathopoulou PG, Benakanakere MR, Galicia JC, Kinane DF. The host cytokine response to *Porphyromonas gingivalis* is modified by gingipains. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(4):11–17.
- Staubli N, Walter C, Schmidt JC, Weiger R, Zitzmann NU. Excess cement and the risk of peri-implant disease-a systematic review. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(10):1278–1290.
- Steenberghe DV, Quirynen M, Naert I, Maffei G, Jacobs R. Marginal bone loss around implants retaining hinging mandibular overdentures, at 4-, 8-and 12-years follow-up. *J Clin Periodontol.* 2001;28(7):628-633.



- Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15(1):49-60.
- Strooker H, de Waal YCM, Bildt MM. Psychological risk indicators for peri-implantitis: A cross-sectional study. *J Clin Periodontol.* 2022;15(10):980-987.
- Takazoe I, Matsukubo T, Katow T. Experimental formation of "corn cob" in vitro. *J Dent Res.* 1976;57(2):384-387.
- Tam V, O'Brien-Simpson NM, Chen YY, Sanderson CJ, Kinnear B, Reynolds EC. The RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes of *Porphyromonas gingivalis* inactivate the Th2 cytokines interleukin-4 and interleukin-5. *Infect Immun.* 2009;77(4):1451–1458.
- Tamai R, Asai Y, Ogawa T. Requirement for intercellular adhesion molecule 1 and caveolae in invasion of human oral epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2005;73(10):6290–6298.
- Tanaka H, Tanabe N, Shoji M, Suzuki N, Katono T, Sato S, et al. Nicotine and lipopolysaccharide stimulate the formation of osteoclast-like cells by increasing macrophage colony-stimulating factor and prostaglandin E2 production by osteoblasts. *Life Sci.* 2006;78(15):1733–1740.
- Tarnow DP. Increasing prevalence of peri-implantitis: how will we manage? *J Dent Res.* 2016;95(1):7-8.
- Tati S, Davidow P, McCall A, Hwang-Wong E, Rojas IG, Cormack B et al. *Candida glabrata* binding to *Candida albicans* hyphae enables its development in oropharyngeal

candidiasis. PLoS Pathog. 2016;12(3):e1005522.

<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005522>

Taylor GW, Borgnakke WS. Periodontal disease: associations with diabetes, glycemic control and complications. *Oral Dis.* 2008;14(3):191–203.

Tawil G, Younan R, Azar P, Sleilati G. Conventional and advanced implant treatment in the type II diabetic patient: surgical protocol and long-term clinical results. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2008;23(4):744–752.

Teitelbaum SL. Bone resorption by osteoclasts. *Science.* 2000;289(5484):1504–1508.

Tetsch P, Schone V. Cytological studies of the gingiva in endosseous extension implantations. *Dtsch Zahnarztl Z.* 1976;31(2):162-165.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):761–767.

Tietzel I, El-Haibi C, Carabeo RA. Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon- $\gamma$ . *PloS ONE.* 2009;4(8):e6499.  
<https://doi.org/10.1371/journal>

Tomasi C, Derks J. Clinical research of peri-implant diseases-quality of reporting, case definitions and methods to study incidence, prevalence and risk factors of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2012;39(12):207–223.

Tonetti MS, Chapple IL, Jepsen S, Sanz M. Primary and secondary prevention of periodontal and peri-implant diseases: Introduction to, and objectives of the 11th

- European Workshop on Periodontology consensus conference. *J Clin Periodontol*. 2015;42(16):S1-S4.
- Tribble GD, Lamont RJ. Bacterial invasion of epithelial cells and spreading in periodontal tissue. *Periodontol 2000*. 2010;52(1):63-68.
- Trisi P, Berardini M, Falco A, Podaliri Vulpiani M, Perfetti G. Insufficient irrigation induces peri-implant bone resorption: an in vivo histologic analysis in sheep. *Clin Oral Implants Res*. 2014;25(6):696–701.
- Trisi P, Perfetti G, Baldoni E, Berardi D, Colagiovanni M, Scogna G. Implant micromotion is related to peak insertion torque and bone density. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(5):467–471.
- Trofa D, Gacser A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev*. 2008;21(4):606–625.
- Ueno D, Nagano T, Watanabe T, Shirakawa S, Yashima A, Gomi K. Effect of the keratinized mucosa width on the health status of periimplant and contralateral periodontal tissues: a cross-sectional study. *Implant Dent*. 2016;25(6):796–801.
- Uppuluri P, Chaturvedi AK, Srinivasan A, Banerjee M, Ramasubramaniam AK, Köhler JR et al. Dispersion as an important step in the *Candida albicans* biofilm developmental cycle. *PLoS Pathog*. 2010;6(3):e1000828.  
<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000828>
- Urizar JMA. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol*. 2022;19:17-21.
- Urzúa B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and

- Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Sabouraudia*. 2008;46(8):783-793.
- Vallejo Aisa J. *Valoración diagnóstica y pronóstica de la citología oral en la enfermedad periimplantaria* [Tesis de doctorado no publicada]. Universidad del País Vasco/Euskal Herriko Unibertsitatea, 2018.
- Vaz P, Gallas MM, Braga AC, Sampaio-Fernandes JC, Felino A, Tavares P. IL1 gene polymorphisms and unsuccessful dental implants. *Clin Oral Implants Res*. 2012;23(12):1404-1413.
- Wang DG, Fan JB, Siao CJ, Berno A, Young P, Sapolsky R et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*. 1998;280(5366):1077–1082.
- Wang IC, Ou A, Johnston J, Giannobile WV, Yang B, Fenno JC et al. Association between peri-implantitis and cardiovascular diseases: A case-control study. *J Periodontol*. 2022;93(5):633-643.
- Webb BC, Thomas CJ, Willcox MD, Harty DW, Knox KW. *Candida*-associated denture stomatitis. Aetiology and management: a review. Part 2. Oral diseases caused by *Candida* species. *Aust Dent J*. 1998;43(1):160-166.
- Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Inv*. 2005;115(2):282-290.
- Weems J.J., Jr. *Candida parapsilosis*: Epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin Infect Dis*. 1992;14(3):756–766.

- Wennstrom JL, Derks J. Is there a need for keratinized mucosa around implants to maintain health and tissue stability? *Clin Oral Implants Res.* 2012;23(6):136-146.
- Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U. Heterogeneity in biofilms. *Fems Microbiol Rev.* 2000;24(5):661–671.
- World Health Organization. Global status report on alcohol and health 2018. World Health Organization (Genova), 2019.  
<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565639>
- Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Cur Rev Musculoskel Med.* 2009;2(1):56-64.
- Wu X, Pan G, McKenna MA, Zayzafoon M, Xiong WC, McDonald JM. RANKL regulates Fas expression and Fas-mediated apoptosis in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2005;20(1)107–116.
- Wu YM, Juo SH, Ho YP, Ho KY, Yang YH, Tsai CC. Association between lactoferrin gene polymorphisms and aggressive periodontitis among Taiwanese patients. *J Periodontol Res.* 2009;44(3):418-424.
- Yilmaz O, Watanabe K, Lamont RJ. Involvement of integrins in fimbriae-mediated binding and invasion by *Porphyromonas gingivalis*. *Cell Microbiol.* 2002;4(5):305–314.
- Yilmaz O, Young PA, Lamont RJ, Kenny GE. Gingival epithelial cell signalling and cytoskeletal responses to *Porphyromonas gingivalis* invasion. *Microbiol.* 2003;149(9):2417–2426.

- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2007;43(1):102–132.
- Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11535-11540.
- Yulis M, Quiros M, Hilgarth R, Parkos CA, Nusrat A. Intracellular Desmoglein-2 cleavage sensitizes epithelial cells to apoptosis in response to pro-inflammatory cytokines. *Cell Death Dis*. 2018;9(3):389. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0380-9>
- Yun PL, Decarlo AA, Collyer C, Hunter N. Hydrolysis of interleukin-12 by *Porphyromonas gingivalis* major cysteine proteinases may affect local gamma interferon accumulation and the Th1 or Th2 T-cell phenotype in periodontitis. *Infect Immun*. 2001;69(9):5650–5660.
- Zhang D, Chen L, Li S, Gu Z, Yan J. Lipopolysaccharide (LPS) of *Porphyromonas gingivalis* induces IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 production by THP-1 cells in a way different from that of *Escherichia coli* LPS. *Innate Immun*. 2007;14(2):99-107.
- Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Res Int*. 2014;2014:16:284836. <https://doi.org/10.1155/2014/284836>
- Zhang Y, Wang T, Chen W, Yilmaz O, Park Y, Jung IY, Hackett M, Lamont RJ. Differential protein expression by *Porphyromonas gingivalis* in response to secreted epithelial cell components. *Proteomics*. 2005;5(1):198–211.

Zhou J, Zhao Y. Osteoprotegerin Gene (OPG) Polymorphisms Associated with Peri-implantitis Susceptibility in a Chinese Han Population. *Med Sci Monit.* 2016;22:4271-4276.

Zhu Z, Shi Z, Yan W, Wei J, Shao D, Deng X, et al. Nonstructural protein 1 of influenza A virus interacts with human guanylate-binding protein 1 to antagonize antiviral activity. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e55920. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055920>

Zitzmann NU, Berglundh T. Definition and prevalence of peri-implant diseases. *J Clin Periodontol.* 2008;35(8):286-291.





## 8. LABURDURAK

ABIEB: Agente Biologikoekin eta Genetikoki Eraldatutako Organismoekin eginiko

ikerketetarako Etika Batzordea

ADN: Azido desoxirribonukleikoa

ADR: *Adrenergic receptor*

AUC: *Area under the curve*

BMP: *Bone Morphogenetic Protein*

BOP: *Bleeding on probing*

BRAF: *v-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B*

BRINP: *BMP/retinoic acid inducible neural specific*

CD: *Cluster of differentiation*

CHST: *Carbohydrate sulfotransferase*

COL: Kolageno

COMQ: Centro Odontológico Medico-Quirúrgico

COMT: *Catechol-O-methyltransferase*

DE: Desbiazio estandarra

DROSHA: *Class 2 ribonuclease III enzyme*

DRD2: *Dopamine receptor D<sub>2</sub>*

EAE: Euskal Autonomia Erkidegoa

ENPP: *Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase*

ESR: *Estrogen receptor*

FGF: *Fibroblastic growth factor*

GBP: *Guanylate-binding protein*

GDF: *Growth differentiation factor*

GFR: *Glial cell line-derived neurotrophic factor receptor*

GIEB: Gizakiekin lotutako Ikerketarako Etika Batzordea

HbA1c: Hemoglobina glikosilatua

HGM: Hezur-galera marjinala

HTR: *HT serotonin receptor*

Ig: Immunoglobulina

IL: Interleukina

IKK: *IκB kinase*

JAK: *Janus kinase*

JNK: *c-Jun N-terminal kinase*

KAT: Kasu Taldea

KOT: Kontrol Taldea

K.a.: Kristo aurreko

K.o.: Kristo ondoren

KCNS: *Potassium voltage-gated channel subfamily S*

KT: Konfiantza tarteak

LOC107986766: lncRNA

LRP: *Low-density lipoprotein receptor*

LTF: Laktoferrina

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MMP: *Matrix metalloproteinase*

MOE: Munduko Osasun Erakundea

MTHFR: *Methylenetetrahydrofolate reductase*

MTRR: *Methionine synthase reductase*

MyD: *Myeloid differentiation primary response*

NF-Kb: *Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*

NRAMP: *Natural resistance-associated macrophage protein*

OPG: *Osteoprotegerine*

OR: *Odds ratio*

PADI: *Programa de Asistencia Dental Infantil* Haurren Hortzak Zaintzeko Programa

PCR: *Polymerase chain reaction* Polimerasaren kate-erreakzioa

PAMP: *Pathogen-associated molecular pattern*

PDGF: *Platelet-derived growth factor*

PG: Polimorfismo genetikoa

PI: Periimplantitisa

POLR: *DNA-directed RNA polymerase*

PMN: Polimorfonuklear

PRK: *Proteina kinase*

PRR: *Pattern Recognition Receptor*

PTH: Paratormona

RANKL: *Receptor Activator for Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand*

RGS: *Regulator of G protein signaling*

RX: Erradiografia

RXP: *Relaxin/Insulin Like Peptide Receptor*

Sap: *Secreted aspartyl proteinase*

SD: *Standard deviation* Desbideratze estandarra

SSTR: *Somatostatin receptor*

SCN: *Sodium voltage-gated channel*

SHMT: *Serine hydroxymethyltransferase*

SMAD: *Small mothers against decantaplegic protein*

SMC: *Structural Maintenance of Chromosome*

SNAP: *Synaptosomal-Associated Protein*

SNP: *Single nucleotide polymorphism*

STAT: *Signal transducer and activator of transcription*

SUFU: *Suppressor of fused homolog*

TGF: *Transforming growth factor*

TNKSBP: *Tankyrase binding protein*

TRPV: *Transient receptor potential cation channel subfamily*

TLR: *Toll-like receptor*

TSC: *Tuberous sclerosis*

CFU: *Colony-forming unit* Kolonia-konformazio-unitatea

UPP: Uridina fosforilasa

TNF: *Tumour necrosis factor*

UPV/ EHU: Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea

VEGF: *Vascular epidermal growth factor*

ZS: Zundaketa-sakonera



## **9. ERANSKINAK**

**9.1. 1. artikulua.** Lafuente-Ibáñez de Mendoza I, Setien-Olarra A, Aguirre-Urizar JM, Marichalar-Mendia X. Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: Systematic review and meta-analysis. Int J Implant Dent 2022;8(1):1-9.

REVIEW

Open Access



# Role of proinflammatory mutations in peri-implantitis: systematic review and meta-analysis

Irene Lafuente-Ibáñez de Mendoza<sup>1</sup> , Amaia Setien-Olarra<sup>2</sup> , Ana María García-De la Fuente<sup>1</sup> , José Manuel Aguirre-Urizar<sup>1</sup> and Xabier Marichalar-Mendia<sup>2\*</sup>

## Abstract

**Purpose:** To perform a systematic review and meta-analysis on the presence of inflammatory polymorphisms in patients with peri-implantitis (PI). PI is the main complication associated to dental implant therapy. Although its main risk factors are history of periodontitis, poor plaque control and lack of regular maintenance, genetic susceptibility could also be a determinant factor for its appearance. Single nucleotide polymorphisms (SNP) are small mutations of the DNA that alter the osseointegration of implants. Inflammatory proteins participate in both destruction of the extracellular matrix and reabsorption of the alveolar bone.

**Methods:** A bibliographical research was made in PubMed, Scopus and Web of Science (keywords: “single nucleotide polymorphism”, “polymorphism”, “periimplantitis”, “SNP” and “implant failure”).

**Results:** There is a statistically significant association of peri-implant bone loss with the homozygotic model of IL-1 $\beta$  (–511) (OR: 2.255; IC: 1.040–4.889).

**Conclusions:** Associations between inflammatory polymorphisms and PI must be taken with caution due to the heterogeneous methodological design, sample size and diagnostic criteria of the studies. Thus, more well-designed studies are needed that analyze the relationship between these and more SNP and PI.

**Keywords:** Inflammation, Meta-analysis peri-implantitis, Single nucleotide polymorphism, Systematic review

## Introduction

The combination of high numbers for partial and total edentulism [1], together with an average life expectancy of over 70 years for the world population [2], shows that treatment with dental implants is a major health advance. However, the biological complications associated with this therapy, preferably peri-implantitis (PI), are frequent and must be prevented [3].

Peri-implantitis is an infectious and inflammatory multifactorial disease affecting more than 45% of patients

with dental implants, which is characterized by progressive loss of the alveolar bone [3]. History of periodontitis, poor plaque control and lack of regular maintenance are the main risk factors of this disorder [4]. Nevertheless, not all individuals with these features end up developing PI. Thus, genetic susceptibility has also been suggested as an important factor in the development of PI [5].

Genetic polymorphisms are individual variations at a given location in the DNA sequence, of which single nucleotide polymorphisms (SNP) are the most common [6]. The detection of SNP can be used to identify altered genes or proteins in a specific disease. Several genotypes of inflammatory proteins are strongly associated with chronic or aggressive periodontitis [7, 8]. In the case of

\*Correspondence: [xabier.marichalar@gmail.com](mailto:xabier.marichalar@gmail.com)

<sup>2</sup> Department of Nursery I, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

PI, different SNP involved in the inflammatory response have also been studied, mainly IL-1 $\beta$  and IL-1 $\alpha$  [9].

IL-1 is a low molecular weight protein that promotes alveolar bone resorption, extracellular matrix destruction and osteoclastogenesis; thus, it plays an important role in bone physiopathology [9]. The most frequent and studied SNP are located at positions 3953 [*IL-1* (+3953)], 511 [*IL-1* (-511)] [10, 11] and 889 [*IL-1 $\alpha$*  (-889)]. SNP of other inflammatory molecules include *IL-10* (-1081) y *IL-6* (-174) and *TNF- $\alpha$*  (-308) [12–14]. The link between these SNP and peri-implantitis has been highly variable, probably due to differences in the diagnostic criteria. The mutation of these genes could trigger an abnormal inflammatory and resorptive response that decreases the osseointegration of dental implants. Discovering the existence of a specific genotypic profile of certain SNP in patients with peri-implantitis would help us assess the level of individual risk and establish appropriate preventive measures.

With this background, we planned to carry out a systematic review and meta-analysis, with the aim of understanding the relationship between the presence of proinflammatory polymorphisms and the development of peri-implantitis.

## Methods

### Information sources and search strategy

The design of this study matches the PRISMA criteria [15]. Systematic bibliographical research was performed in PubMed (US National Gallery of Medicine), Web of Science/Knowledge and Scopus, with the keywords “single nucleotide polymorphism”, SNP, “peri implantitis”, and “implant failure”: (“single nucleotide polymorphism” AND “peri implantitis”; “single nucleotide polymorphism” AND “implant failure”; SNP AND “peri implantitis”: SNP AND peri-implantitis; SNP AND “implant failure”). A manual search of the referenced studies, as well as of prominent journals of the field, was carried out aiming to include additional papers.

PECOS question was: patients with dental implants (population), with SNP of proinflammatory proteins (exposure), in contrast to patients with dental implants who do not have proinflammatory SNP (comparison), to study the effect of these SNP in the onset of peri-implantitis (outcome). Only longitudinal observational studies were included (type of study).

### Eligibility criteria

The articles selected for this work met the following inclusion criteria: (1) being published until October 2021; (2) being written in English or Spanish (guarantee of full comprehension of content); (3) human studies. Exclusion criteria were: (1) studies that did not analyze

proinflammatory polymorphisms and/or did not show the genotype frequencies; (2) studies on peri-implant disease that did not report the peri-implant bones loss; (3) previous meta-analysis or reviews, and (4) case reports, conferences or chapter of books. The information extracted from each study was: author and year of publication, type of study, number of patients (with and without PI) and genotype frequency of the polymorphisms.

### Selection process

Two independent reviewers made a duplicate bibliographical research (ILIM, ASO). Title and abstract of all registers were evaluated, and then, these were analyzed taking into account the inclusion and exclusion criteria. Any disagreement between the them was resolved by a third reviewer (XMM) to minimize risk of bias. Data about the included studies were gathered by two reviewers (ILIM, ASO) and double-checked by another three (XMM, AMGF, JMAU), to guarantee the integrity of the contents.

### Quality analysis

We used modified Newcastle-Ottawa Scale (NOS) [16] to assess the methodological quality of the included studies. This system analyzes the risk of bias of nonrandomized studies, taking into account three domains and eight items for case-control studies: selection, comparability and outcome. The total maximum score is 10; a study with a score from 8 to 10 has high quality; 4 to 7, high risk of bias; and 0 to 3, very high risk of bias.

### Statistical analysis

To analyze the heterogeneity of the studies,  $I^2$  test was applied. Fixed-effect model was used when  $I^2 < 50\%$ . To evaluate the correlation of PI with the susceptibility to different genotypes, the following genotypic models were carried out: heterozygous model (T/C vs T/T) and homozygous model (C/C vs T/T). For each model the odds ratio (OR) and 95% confidence interval (CI 95%) were obtained. Statistical analysis was performed with the OpenMeta tool (Analyst).

## Results

### Results of the search

We obtained a total of 192 records in the initial research, out of which 103 were eliminated because they were duplicates. Additionally, three articles were included by manual search. After the initial screening, 47 articles were excluded: 43 for not investigating the presence of SNP in PI and 4 for not being available in full-text. Thus, 45 registers were analyzed for their suitability, but 15 were eliminated: 13 because they were previous meta-analyses or literature reviews and another 2 because



they were conference texts or book chapters. Also, we excluded 13 registers that did not analyze inflammatory polymorphisms and 5 that did not indicate the parameters used for the diagnosis of peri-implant disease. Finally, 12 studies were selected for the systematic review, whose data are shown in Table 1 [10–14, 17–23].

We were only able to use eight studies to perform the meta-analysis, due to lack of genotype data [10, 12, 13, 17–19, 21–23]. The summary of the selection process is shown in Fig. 1.

### Characteristics of included studies

In total, the included studies investigated 1015 patients, of 499 with peri-implantitis 516 without peri-implantitis. From these, 98 were from Asia (China and Japan) and the rest from other countries of Europe (Austria, Belgium, Germany, Italy, Turkey, Spain), America (Brazil) and Africa (Egypt). The authors used either radiographic alveolar bone loss (ABL) [10–14, 17, 19, 20, 22, 23] or peri-implant pocket depth (PPD) analysis [18, 21] to make the diagnosis (Table 1).

#### *IL-1β (+ 3953) and IL-1β (– 511)*

Most of the studies included in this review analyze the possible relationship between the presence of SNP IL-1β (+ 3953) and the development of PI [10, 11, 17–21]. However, only two studies [10, 20] observed a statistically significant association between the composite genotype IL-1β (+ 3945) and IL-1α (– 889), and patients with PI.

The link of SNP IL-1β (– 511) and peri-implantitis has been analyzed in four studies [10, 17, 19, 20], but only two conducted in Japan [17, 19] recognized a direct relation to peri-implant bone loss.

#### *IL-10 (– 1081) y IL-6 (– 174)*

The IL-10 SNP (– 1081) was assessed in two studies [13, 23], and it was only associated to PI in German smoker patients or with a history of periodontitis [23]. On the contrary, IL-6 SNP (– 174) was only associated with PI in Serbian individuals [14, 21, 23].

#### *TNF-α (– 308)*

TNF-α genotype (– 308) was only linked to peri-implant disease in Serbian patients [22, 23], and not in Brazilians [12, 13].

### Meta-analysis

Our study revealed that there are no statistically significant link between the presence of IL-1β (+ 3953) nor TNF-α (– 308) polymorphisms and peri-implantitis (Figs. 2 and 3). However, we did observe a risk association between the presence of the C/C genotype of the SNP IL-1β (– 511) and peri-implantitis (T/C vs T/T:  $I^2=0\%$ ,  $p=0.921$ ; OR: 0.902; IC 95% 0.510–1.595 and C/C vs T/T:  $I^2=0\%$ ,  $p=0.555$ ; OR: 2.255; IC 95%: 1.040–4.889) (Fig. 4).

### Quality of studies

After applying modified NOS assessment, 16.67% of the studies revealed 8 stars and 83.3% of them 6 (Table 2). Overall risk of bias was low.

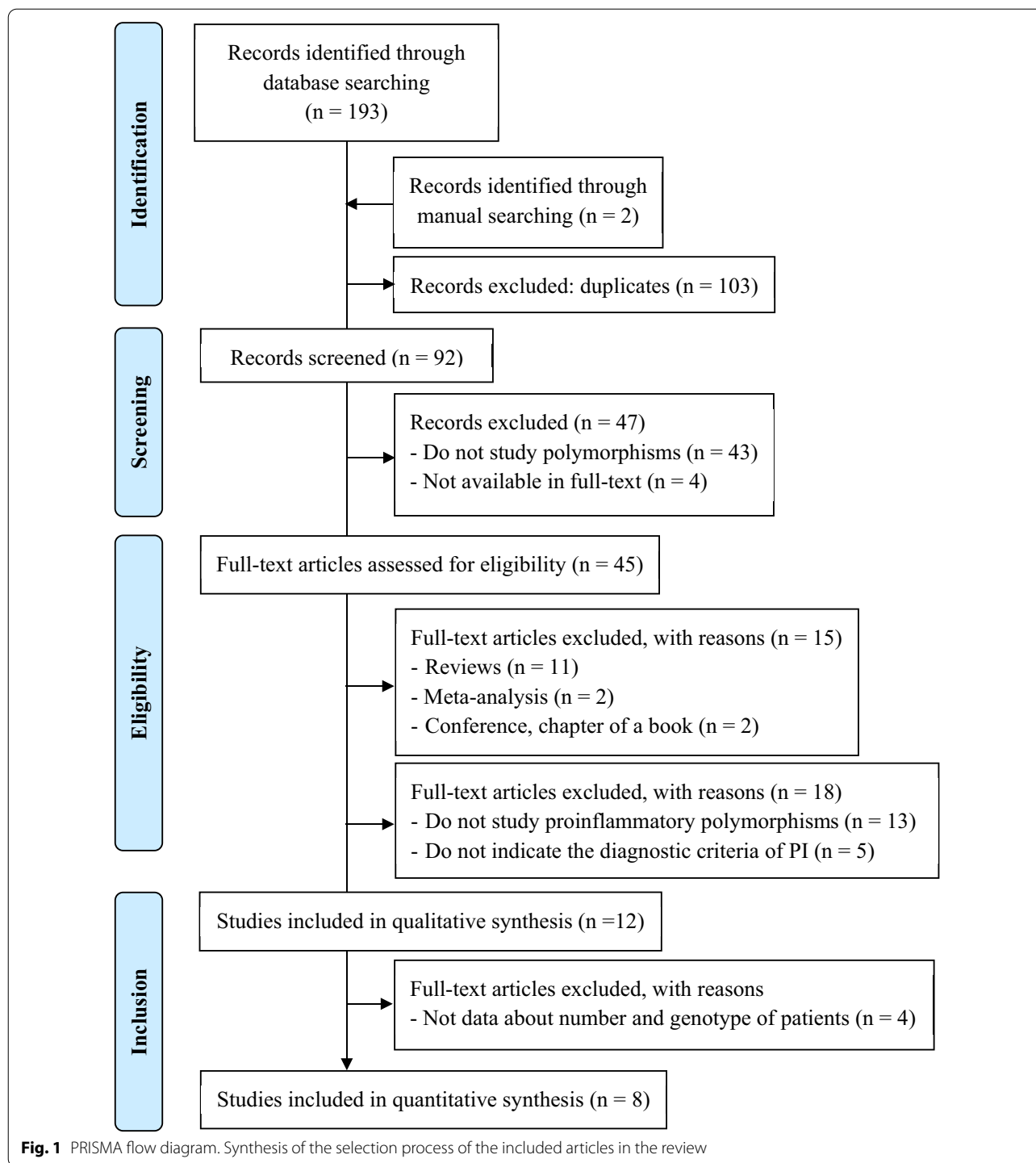
### Discussion

The first cases of peri-implantitis were described as “inflammatory reactions with loss of supporting bone in the tissues surrounding a functioning implant” [24]. PI is physiopathologically different to periodontitis and has

**Table 1** Main data of the included studies

Authors, year	Patients			Diagnostic criteria for diagnosis of peri-implantitis
	Ethnicity	Case	Control	
Shimpuku et al. 2003	Japan	17	22	ABL > 0.5 mm
Laine et al. 2006	Belgium	71	44	ABL (3 threads), BOP, pus
Cury et al. 2007	Brazil	17	19	ABL (3 threads), BOP, pus
Lachmann et al. 2007	Germany	11	18	PPD > 4 mm
Lin et al. 2007	Japan	29	30	ABL > 0.5 mm
Hamdy et al. 2007	Egipt	25	25	PPD > 4 mm, ABL, BOP
Guroi et al. 2011	Turkey	32	46	ABL > 3 mm, PPD > 5 mm, BOP, pus
Melo et al. 2012	Italy	16	31	PPD > 4 mm, BOP, pus
Ladeira-Casado et al. 2013	Brazil	31	40	ABL > 3 mm, pus
García-Delaney et al. 2015	Spain	27	27	ABL > 2 mm, PD > 4 mm, BOP, pus
Rakic et al. 2015	Germany	189	180	ABL (> 2 threads), PPD > 5 mm, BOP
Petkovic-Curcin et al. 2017	Serbia	34	34	ABL (> 2 threads), PPD > 4 mm, BOP

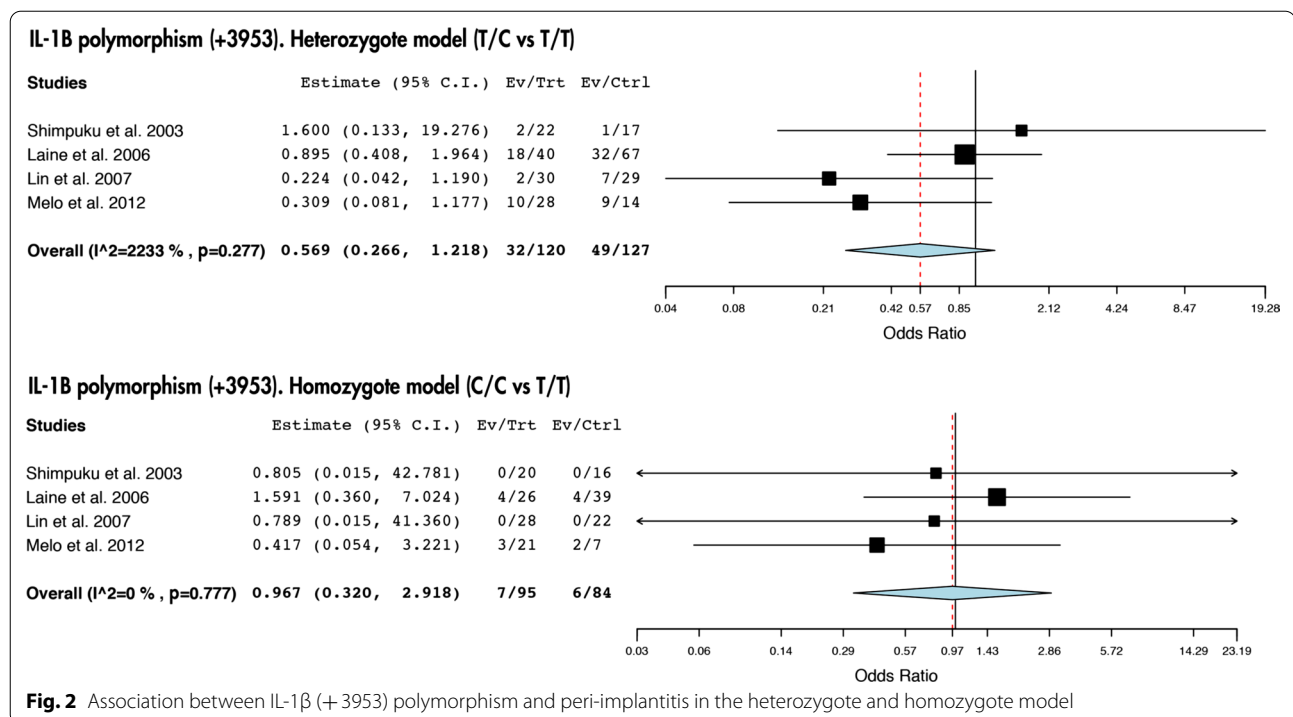
Case: patients with peri-implantitis. Control: patients without peri-implantitis. ABL: alveolar bone loss; BOP: bleeding on probing; PPD: peri-implant pocket depth



recently been considered as an inflammatory disorder (“Peri-implant Conditions and Diseases”) [25, 26].

Inflammation is a physiological response that participates in many acute and chronic diseases in humans [27]. The term interleukin-1 was firstly used in the International Lymphokine Workshop in Ermatingen

in 1979 [28], to define “a macrophagic product that stimulates T and B cells, with non-immunological properties”. Because there is strong evidence of the role of IL-1 $\beta$  in the physiopathology of periodontitis [8], recent research has tried to discover its link to peri-implantitis.

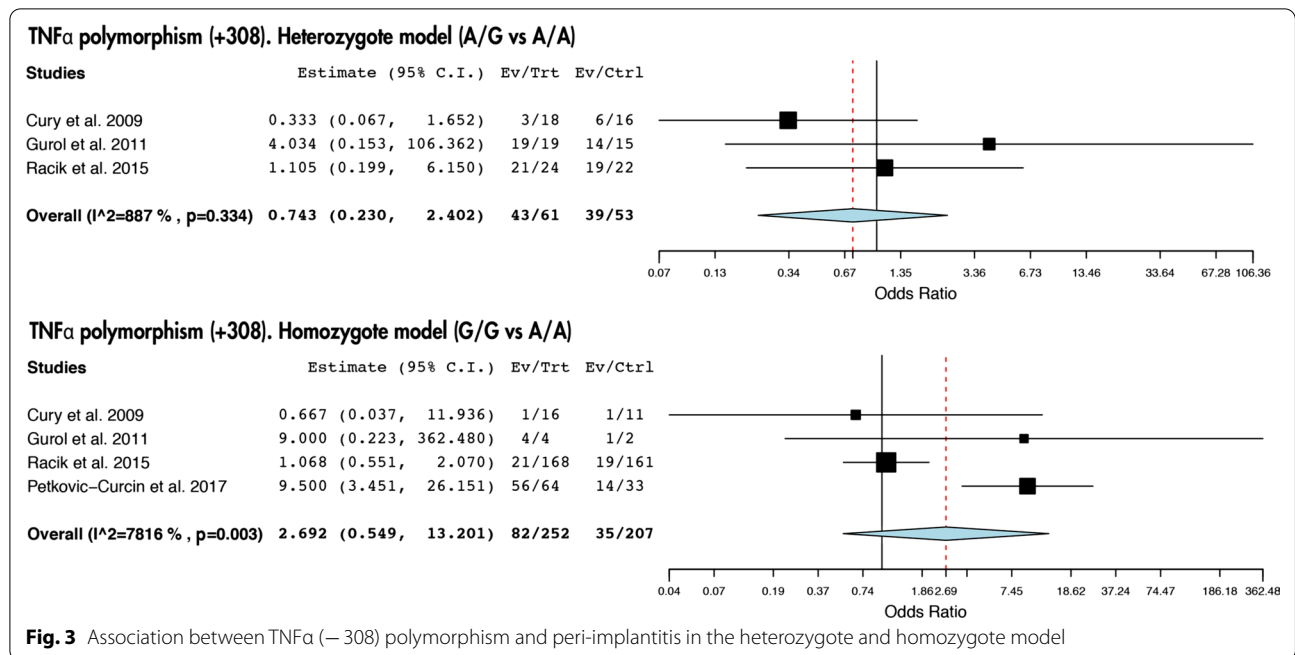


After conducting this review, we found that only two authors demonstrated a significant association between the composite genotype of IL-1β (+3945) and IL-1α (−889) and the presence of peri-implantitis [10, 18]. This genotype has already been associated to patients with chronic periodontitis, but not with aggressive periodontitis [8]. Thus, we believe that there may be only a specific group of patients with peri-implantitis who present this genotypic profile. Myeloid differentiation factor-88 (MyD88) is responsible for the activation of proinflammatory cytokines IL1β and IL-1α, inducing at the same time an intracellular cascade system that secretes both proteins to the extracellular matrix [29]. Unlike IL-1β, IL-1α has a silent nuclear expression under normal homeostasis that changes during the inflammatory response [29]. This may explain why IL-1α polymorphism [IL-1α (−899)] alone is not independently associated with the development of PI.

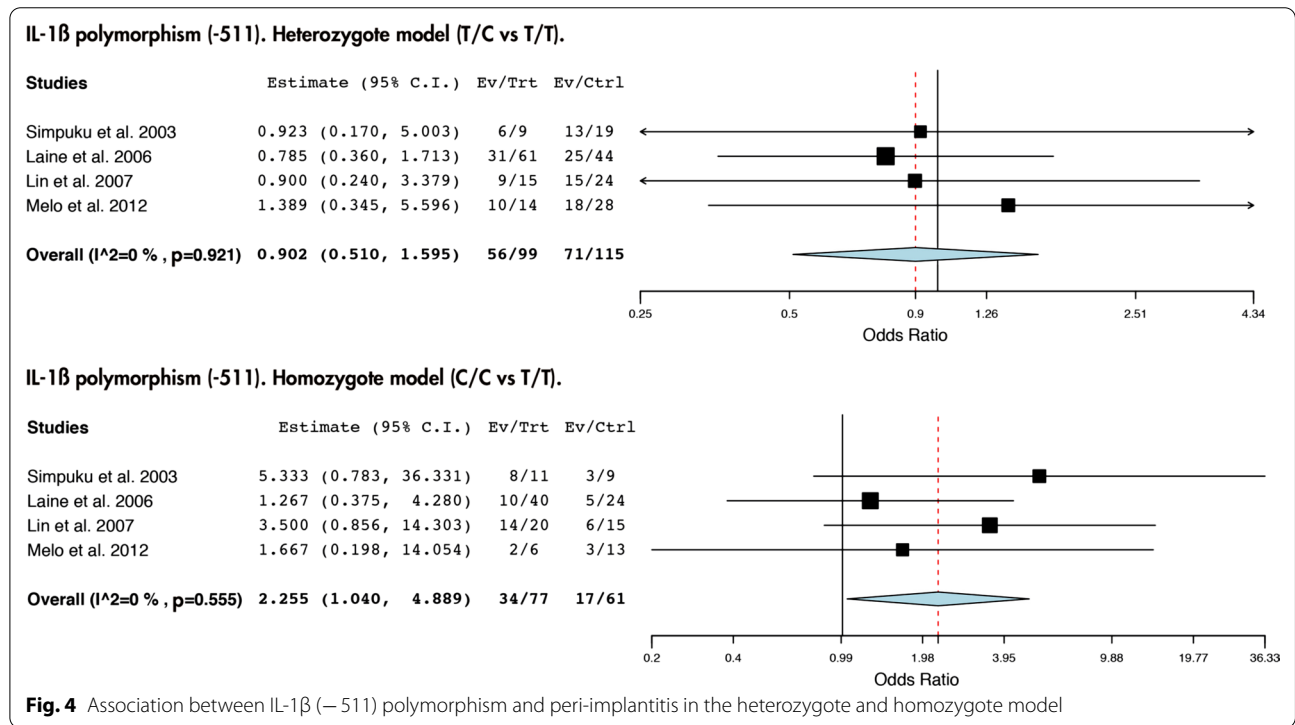
During the eligibility analysis, several studies were excluded because they did not indicate the diagnostic criteria of PI. From these, Feloutzis et al. [30] and Grucica et al. [31] found a significant association between SNP IL-1β (+3953) and peri-implant bone loss in heavy smokers (>20 cigarettes/day). However, they did not indicate whether the patients had peri-implantitis. Furthermore, our analysis did not find a significant association between IL-1β (+3953) polymorphism, tobacco use and PI [15, 16, 25, 27].

In contrast, two study groups from Japan reported a strong link between IL-1β (−511) and PI [17, 19], which remained significant at the final meta-analysis (Fig. 4). This positive result could respond to the fact that some authors used ABL >0.5 mm as diagnostic criteria for PI (Table 1). Although the first sign of peri-implantitis can be the presence of a bone loss (0.5 mm) [32], diagnosis of PI is based on: (1) presence of bleeding and/or suppuration on gentle probing, (2) probing depths of ≥6 mm, or bigger than previous examinations, and (3) bone levels ≥3 mm apical of the most coronal portion of the intraosseous part of the implant, or greater than initial bone remodeling [26]. Therefore, the PI cases of several studies [17, 19] could currently be reclassified as peri-implant health and more studies are needed to further clarify this relationship. Furthermore, the fact that the other studies that also analyzed this SNP did not observe such link, with more precise diagnostic criteria of PI (Table 1), make us believe that the C/C genotype of IL-1β (−511) would truly be associated to alveolar bone loss and not actual peri-implantitis [10, 21].

The diagnostic criteria of peri-implantitis have been in constant change throughout the years, and it is not possible to ensure that all the patients were correctly classified as either healthy or sick. Since these variations are very important in risk assessment studies, the application of the latest classification of periodontal diseases



**Fig. 3** Association between TNF $\alpha$  (–308) polymorphism and peri-implantitis in the heterozygote and homozygote model



**Fig. 4** Association between IL-1 $\beta$  (–511) polymorphism and peri-implantitis in the heterozygote and homozygote model

may reduce this bias, allowing the homogeneity of future investigations [33].

IL-10 is a potent anti-inflammatory cytokine that reduces the synthesis of proinflammatory chemokines (IL-1, TNF- $\alpha$ ) and extracellular matrix proteins

(gelatinase, collagenase), while enhancing osteoblast differentiation and inhibiting osteoclast formation [34]. Mutations in its gene could affect bone homeostasis. However, the IL-10 SNP (–1081) has only been associated with patients who smoke or have a history of

**Table 2** Quality assessment of the included studies: NOS tool

Authors, year	Type of study	New Castle-Ottawa Scale (NOS)		
		Selection	Comparability	Exposure
Shimpuku et al. 2003	Case-control	★★★	★	★★
Laine et al. 2006	Case-control	★★★	★★	★★
Cury et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Lachmann et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Lin et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Hamdy et al. 2007	Case-control	★★★	★	★★
Gurul et al. 2011	Case-control	★★★	★	★★
Melo et al. 2012	Case-control	★★★	★	★★
Ladeira-Casado et al. 2013	Case-control	★★★	★	★★
García-Delaney et al. 2015	Case-control	★★★	★	★★
Rakic et al. 2015	Case-control	★★★	★★	★★
Petkovic-Curcin et al. 2017	Case-control	★★★	★	★★

periodontitis [23]. In contrast, IL-6 has a dual role in bone remodeling. Under normal conditions, it suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation of osteoclast progenitors, and under inflammatory conditions it induces RANKL expression in osteoblasts and facilitates the proliferation of osteoclast progenitors [35]. Thus, alterations on IL-6 gene need to be evaluated together with those of other inflammatory markers. This may explain why the IL-6 SNP (−174) does not affect all individuals equally [23].

A proinflammatory cytokine that also plays an essential role in bone remodeling and homeostasis is tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), suppressing osteoblastic proliferation and activating osteoclastogenesis from its early stage, when marrow-derived macrophages are still osteoclast precursor cells [36]. In this work only few authors have recognized a relation between the TNF- $\alpha$  (−308) SNP and peri-implantitis [22, 23]. Since the meta-analysis confirmed this association as significant, further studies with more patients will be needed.

This systematic review has some limitations. First, the evidence level of the included studies was low (class III) [37]. Therefore, the reliability of our conclusions might be low. And second, the sample sizes in the investigated studies were small. High-evidence SNP studies normally need very more patients and, thus, the power analysis might be as low as 5%. Taking all this into account, it is necessary to plan more well-designed studies with larger samples, in order to further analyze the involvement of these genetic polymorphisms and more inflammatory molecules involved in peri-implant processes.

## Conclusions

In summary, after performing this systematic review and meta-analysis we conclude that, currently, there is no evidence that patients carrying the IL-1 $\beta$  (+3945), IL-10 (−1081), IL-6 (−174) or TNF- $\alpha$  (−308) SNPs have a higher risk of developing peri-implantitis. However, individuals with the C/C genotype of the SNP IL-1 $\beta$  (−511) and those with composite genotype IL1 $\beta$  (+3945) and IL-1 $\alpha$  (−889) may have a higher risk for peri-implantitis. Also, patients who smoke more than 20 cigarettes a day and have IL-1 $\beta$  (+3953) polymorphism would have a higher risk of peri-implant bone loss.

## Acknowledgements

Not applicable.

## Authors' contributions

Each author is expected to have made substantial contributions to the conception OR design of the work; OR the acquisition, analysis, OR interpretation of data; OR the creation of new software used in the work; OR have drafted the work or substantively revised it. ILIM: conceptualization and design of the work; acquisition and interpretation of data; drafted the work. ASO: design of the work; acquisition and analysis of data; drafted the work. AMGCL: interpretation of data; substantively revised the work. JMAU: conception of the work; interpretation of data; substantively revised the work. XMM: conception of the work; analysis of data; substantively revised the work. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article [and its additional information files].

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Stomatology II, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Spain. <sup>2</sup>Department of Nursery I, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Spain.

Received: 16 July 2021 Accepted: 11 January 2022

Published online: 21 January 2022

## References

- Müller F, Naharro M, Carlsson GE. What are the prevalence and incidence of tooth loss in the adult and elderly population in Europe? *Clin Oral Implants Res.* 2017;18(3):2–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2007.01459.x>.
- World Health Organization. Global health observatory (GHO) data. Life expectancy. Geneva: World Health Organization; 2016. [https://www.who.int/gho/mortality\\_burden\\_disease/life\\_tables/situation\\_trends/en/](https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/situation_trends/en/).
- Lee CT, Huang YW, Zhu L, Weltman R. Prevalences of peri-implantitis and peri-implant mucositis: systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2017;62:1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.04.011>.
- Dreyer H, Grischke J, Tiede C, Eberhard J, Schweitzer A, Toikkanen SE, et al. Epidemiology and risk factors of peri-implantitis: a systematic review. *J Periodontol Res.* 2018;53(5):657–81. <https://doi.org/10.1111/jre.12562>.
- Lee S, Kim JY, Hwang J, Kim S, Lee JH, Han DH. Investigation of pathogenic genes in peri-implantitis from implant clustering failure patients: a whole-exome sequencing pilot study. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e99360. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099360>.
- Smith A, Krishnan L, Stein LD, International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Genome Res.* 2005;15(11):1592–3. <https://doi.org/10.1101/gr.4413105>.
- Laine ML, Crielaard W, Loos BG. Genetic susceptibility to periodontitis. *Periodontol 2000.* 2012;58(1):37–68. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00415.x>.
- Yoshie H, Kobayashi T, Tai H, Galicia JC. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007;43(1):102–32. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00164.x>.
- Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. *Immunol Rev.* 2018;281(1):8–27. <https://doi.org/10.1111/imr.12621>.
- Laine ML, Leonhardt Å, Roos-Jansäker AM, Peña AS, Van Winkelhoff AJ, Winkel EG, Renvert S. IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(4):380–5. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01249.x>.
- García-Delaney C, Sánchez-Garcés MÁ, Figueiredo R, Sánchez-Torres A, Gay-Escoda C. Clinical significance of interleukin-1 genotype in smoking patients as a predictor of peri-implantitis: a case-control study. *Med Oral Pat Oral Cir Bucal.* 2015;20(6):e737–43. <https://doi.org/10.4317/medoral.20655>.
- Curry PR, Joly JC, Freitas N, Sendyk WR, Nunes FD, de Araújo NS. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  gene polymorphism on peri-implant bone loss following prosthetic reconstruction. *Implant Dent.* 2007;16(1):80–8.
- Guroi C, Kazazoglu E, Dabakoglu B, Korachi M. A comparative study of the role of cytokine polymorphisms interleukin-10 and tumor necrosis factor alpha in susceptibility to implant failure and chronic periodontitis. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2011;26(5):955–60.
- Ladeira-Casado P, Villas-Boas R, de Mello W, Leite Duarte ME, Mauro GJ. Peri-implant disease and chronic periodontitis: is interleukin-6 gene promoter polymorphism the common risk factor in a Brazilian population? *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2013;28(1):35–43.
- Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *Ann Intern Med.* 2009;151(4):264–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
- Wells GA, Tugwell P, O'Connell D, Welch V, Peterson J, Shea B, Losos M. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses. 2015. [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp).
- Shimpuku H, Nosaka Y, Kawamura T, Tachi Y, Shinohara M, Ohura K. Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(4):423–9. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.110823.x>.
- Lachmann S, Kimmerle-Müller E, Axmann D, Scheideler L, Weber H, Haas R. Associations between peri-implant crevicular fluid volume, concentrations of crevicular inflammatory mediators, and composite IL-1A–889 and IL-1B+ 3954 genotype: a cross-sectional study on implant recall patients with and without clinical signs of peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2007;18(2):212–23. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2006.01322.x>.
- Lin YH, Huang P, Lu X, Guan DH, Man Y, Wei N, Gong P. The relationship between IL-1 gene polymorphism and marginal bone loss around dental implants. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(11):2340–4. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.06.673>.
- Hamdy AAEM, Ebrahim MAEM. The effect of interleukin-1 allele 2 genotype (IL-1a— 889 and IL-1b+ 3954) on the individual's susceptibility to peri-implantitis: case-control study. *J Oral Implants.* 2011;37(3):325–34. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-09-00117.1>.
- Melo RF, Lopes BM, Shibli JA, Marcantonio Junior E, Marcantonio RAC, Galli GMT. Interleukin-1 $\beta$  and interleukin-6 expression and gene polymorphisms in subjects with peri-implant disease. *Clin Implants Dent Relat Res.* 2012;14(6):905–14. <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2010.00325.x>.
- Rakic M, Petkovic-Curcin A, Struillou X, Matic S, Stamatovic N, Vojvodic D. CD14 and TNF $\alpha$  single nucleotide polymorphisms are candidates for genetic biomarkers of peri-implantitis. *Clin Oral Invest.* 2015;19(4):791–801.
- Petkovic-Curcin A, Zeljic K, Cikota-Aleksic B, Dakovic D, Tatic Z, Magic Z. Association of cytokine gene polymorphism with peri-implantitis risk. *Int J Oral Maxillofac Implant.* 2017;32(5):e241–8.
- Albrektsson T, Isidor F. Consensus report of session IV. In: Lang NP, Karring T, editors. *Proceedings of the 1st European Workshop on periodontology.* 1st ed. London: Quintessence Publishing; 1994. p. 365–9.
- Lang NP, Berglundh T. Working Group 4 of Seventh European Workshop on P. Peri Implant diseases: where are we now?—Consensus of the Seventh European Workshop on Periodontology. *J Clin Periodontol.* 2011;38(11):178–81. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01674.x>.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45(20):S246–66. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12954>.
- Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev.* 2007;65(3):S140–6. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2007.tb00352.x>.
- Aarden LA, Brunner TK, Cerottini C, Dayer M, de Weck AL, Dinarello CA, et al. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. *J Immunol.* 1979;123(6):2928–9.
- Rider P, Carmi Y, Guttman O, Braiman A, Cohen I, Voronov E, et al. IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$  recruit different myeloid cells and promote different stages of sterile inflammation. *J Immunol.* 2011;187(9):4835–43. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102048>.
- Feloutzis A, Lang NP, Tonetti MS, Bürgin W, Brägger U, Buser D, Duff GW, Kornman KS. IL-1 gene polymorphism and smoking as risk factors for periimplant bone loss in a well-maintained population. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(1):10–7. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.2003.140102.x>.
- Gruica B, Wang HY, Lang NP, Buser D. Impact of IL-1 genotype and smoking status on the prognosis of osseointegrated implants. *Clin Oral Implant Res.* 2004;15(4):393–400. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01026.x>.
- Derks J, Schaller D, Hakansson J, Wennstrom JL, Tomasi C, Berglundh T. Peri-implantitis-onset and pattern of progression. *J Clin Periodontol.* 2016;43(4):383–8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12535>.
- Caton JG, Armitage G, Berglundh T, Chapple IL, Jepsen S, Kornman KS, et al. A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions—introduction and key changes from the 1999

classification. *J Periodontol.* 2018;45(20):S1–8. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12935>.

34. Zhang Q, Chen B, Yan F, Guo J, Zhu X, Ma S, et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *BioMed Res Int.* 2014;16:284836. <https://doi.org/10.1155/2014/284836>.
35. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF- $\kappa$ B signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11535–40.
36. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and paradoxical effects of TNF- $\alpha$  on bone homeostasis. *Front Immunol.* 2014;5:48. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00048>.
37. Burns PB, Rohrich RJ, Chung KC. The levels of evidence and their role in evidence-based medicine. *Plast Reconstr Surg.* 2011;128:305–10.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:**

- ▶ Convenient online submission
- ▶ Rigorous peer review
- ▶ Open access: articles freely available online
- ▶ High visibility within the field
- ▶ Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ▶ [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

---

**9.2. 2. artikulua.** Lafuente-Ibanez de Mendoza I, Cayero-Garay A, Quindós-Andrés G, Aguirre-Urizar J. A systematic review on the implication of Candida in peri-implantitis. Int J Implant Dent 2021;7(1):1-9.



REVIEW

Open Access



# A systematic review on the implication of *Candida* in peri-implantitis

Irene Lafuente-Ibáñez de Mendoza<sup>1</sup>, Amaia Cayero-Garay<sup>1</sup>, Guillermo Quindós-Andrés<sup>2</sup> and José Manuel Aguirre-Urizar<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** *Candida* is a heterogeneous fungal genus. Subgingival sulcus is a refuge for *Candida*, which has already been related to the pathogenic inflammation of periodontitis. This work aims to review the presence of *Candida* in the sulcular fluid surrounding dental implants and discuss its potential role in peri-implantitis.

**Results:** A bibliographical research was performed in PubMed, Scopus and Web of Science databases, with the keywords *candida*, peri-implantitis, periimplantitis, “dental implant” and implant. Newcastle-Ottawa Scale was used to assess the methodological quality of the included studies. At the end, nine observational studies were included, which analysed 400 dental implants with PI and 337 without peri-implantitis. Presence of *Candida* was assessed by traditional microbiological culture in blood agar or/and CHROMagar, though identification was also detected by quantitative real-time PCR, random amplified polymorphic DNA or ATB ID 32C. Dentate individuals and implants with peri-implantitis (range, 3–76.7%) had a bigger presence of *Candida*. *C. albicans* was the most isolated species, followed by *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, and *Candida dubliniensis*.

**Conclusion:** *Candida* is part of the microbiological profile of the peri-implant sulcular fluid. More studies are needed to compare the link between *Candida* and other microorganisms and to discover the true role of these fungi in peri-implantitis.

**Keywords:** *Candida*, Peri-implantitis, Systematic review

## Background

Oral rehabilitation with dental implants is a predictable and safe therapeutic procedure to treat tooth loss, in both partially and completely edentulous patients. Throughout the years, more advances have been made in the design, surface and chirurgical protocols of the implant systems, whose success can reach up to 95% of cases [1, 2].

Mechanical and biological complications are the main cause of dental implant failure. Peri-implantitis (PI) is a multifactorial infectious disease characterized by inflammation in the peri-implant mucosa and a progressive loss of supporting bone [3]. Although inflammatory

response is more pronounced in the tissues surrounding the implants than in those surrounding the teeth [4], the microbiological environment associated to PI is similar to the observed in conventional periodontal disease, which includes anaerobic Gram-negative bacteria, such as *Prevotella nigrescens*, *Campylobacter rectus* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [5]. Other microorganisms, for example fungi, like *Candida*, could also participate in the onset and development of PI, since *Candida* colonization and biofilm formation is relatively common on other metallic surfaces, like hip and knee prostheses [6, 7]. However, there is a direct association between surface roughness and hydrophobicity with biofilm development as surface topography influenced microbial adhesion. For instance, titanium is one of the biomaterials most resistant to microbial

\* Correspondence: [Josemanuel.aguirre@ehu.eus](mailto:Josemanuel.aguirre@ehu.eus)

<sup>1</sup>Department of Stomatology II, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Vizcaya, Spain  
Full list of author information is available at the end of the article

colonization and to the development of *C. albicans* and bacterial biofilms [8].

*Candida* is a commensal of the oral cavity that can be isolated from many healthy individuals but can trigger mucosa infections (candidiasis) associated to different predisposing factors, like immunodeficiency [9]. Subgingival sulcus can also play as a refuge for pathogenic fungi [10]. In addition, different species of *Candida* have already been associated with the maintenance of periodontal inflammation in periodontitis [11, 12]. Nevertheless, the mechanisms by which *Candida* may enhance bone resorption, especially in the jaws, are unclear.

*Candida albicans* is the species more frequently isolated in PI, developing thick biofilms over the peri-implant surface [10]. Given its ability to adhere to the implant area in intimate contact with the bone, it has been hypothesized that *Candida* could also contribute to the progression of PI, but this link has yet to be elucidated.

The objective of this work is to make a systematic review of the literature, aiming to recognize the presence of different species of *Candida* in the peri-implant niche and to discuss its role in the pathogenesis and progression of peri-implantitis.

## Methods

### Research strategy

The methodological design of this study matches the PRISMA criteria and guidelines [13]. In this systematic review, we address the question “what is the role of *Candida* in the development of peri-implantitis?”.

Two independent co-authors (ILIM, ACG) performed a systematic bibliographical research in PubMed (US National Gallery of Medicine), Scopus and Web of Science/Knowledge. The search strategy consisted in different combinations of the MeSH keywords: *Candida*, peri-implantitis, periimplantitis, “dental implant” and implant (*candida* AND peri-implantitis; *candida* AND periimplantitis; *candida* AND dental implant; *candida* AND implant).

### Inclusion and exclusion criteria

Inclusion criteria were studies published in English or Spanish until December 2020 in patients with dental implants and diagnosis of PI and/or analysing samples from the sulcular fluid surrounding dental implants. Among exclusion criteria were case reports, reviews, position papers, and author opinions. Moreover, those studies not available in full format and experimental studies were also excluded.

### Selection of the studies and data collection

The study selection and data extraction were also performed by two reviewers (JMAU and ILIM). A third one

(JMAU) participated in the decision-making in case of doubt about the inclusion of the studies. Also, if essential data for the review was missing or unclear, the corresponding author clarified the problem.

The titles and abstracts of the retrieved references were screened for relevance and after this, the full texts of all articles potentially eligible were analysed against the inclusion/exclusion criteria. In order to collect the information of the different studies retrieved, a standard document was utilized for data regarding authors, year of publication, study design, diagnostic criteria, clinical specimens, implant systems used, and microbiological methods. In addition, quantitative data on the isolation of *Candida* and other microorganisms were collected for both peri-implantitis and healthy implants.

For categorical variables, we performed a descriptive statistical analysis to obtain frequencies and percentages, as well as to determine the average and standard deviation for quantitative variables.

### Risk of bias

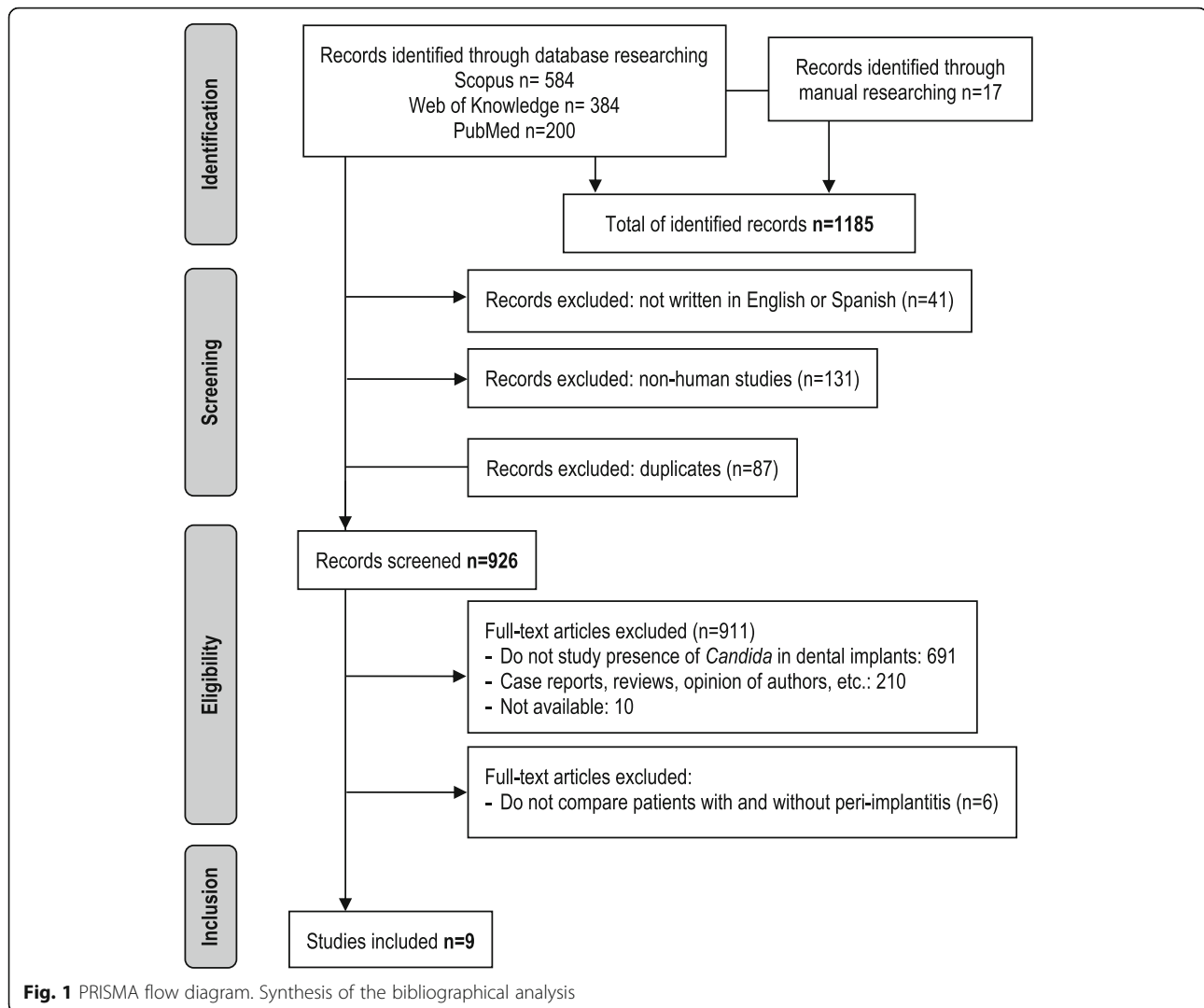
A modified Newcastle-Ottawa Scale (NOS) was used to assess the methodological quality of the included studies [14]. This system analyses the risk of bias of nonrandomized studies, taking into account three domains and eight items for cohort studies: selection, comparability and outcome. The total maximum score is 9; a study with a score from 7 to 9 has high quality; 4 to 6, high risk of bias; and 0 to 3, very high risk of bias.

## Results

### Bibliographical search and retrieval

The selection process of search and retrieval of literature is showed in Fig. 1. Initially, 1185 records were retrieved from databases, from which 41 were excluded due to not being published in English or Spanish, 131 because they were not made in humans and 87 for being duplicates. Thus, 926 articles were screened, but 691 were eliminated because they did not study the presence of *Candida* in dental implants, another 210 for being case reports, reviews or author opinions and other 10 for not being available in full-text.

After the detailed analysis, 15 articles studying the presence of *Candida* in patients with dental implants were included. However, during the extraction data process, we saw that only nine of them compared patients with and without PI, which accounted for the 0.78% of the initial number (Table 1) [10, 15–22]. So, the remaining six manuscripts were discarded since they studied patients with dental implants but without diagnosis of the peri-implant status [2, 23–27].

**Table 1** Clinical data of the included studies

Authors and year	Country	Assessment of <i>Candida</i>	Patients			Mean age (years)	Dental implants		
			Total	PI	Healthy		Total	PI	Healthy
Rosenberg et al. 1991 [15]	USA	-	75	11	64	-	83	-	-
Leonhardt et al. 1999 [16]	Sweden	Blood agar	88	37	51	63	-	-	-
Listgarten et al. 1999 [17]	USA	Blood agar	41	41	0	59	44	44	0
Albertini et al. 2015 [18]	Spain	CHROMagar	33	33	0	67.1	48	48	0
Canullo et al. 2015 [19]	Italy	qPCR	534	53	481	62,25	235	231	1276
Schwarz et al. 2015 [20]	Germany	qPCR	29	19	10	-	29	19	10
Bertone et al. 2016 [21]	Argentine	CHROMagar	40	40	0	56	89	49	40
Alrabiah et al. 2019 [10]	Saudi Arabia	CHROMagar	84	43	41	53,65	84	43	41
Alsahhaf et al. 2019 [22]	Saudi Arabia	CHROMagar	126	84	42	55,77	126	84	42

PI peri-implantitis

### Clinical and microbiological characteristics of the included studies

The microbiological analysis was performed, in all the studies, collecting samples from the sulcular fluid with sterile paper points for different periods. Presence of *Candida* was assessed by traditional microbiological culture in blood agar [16, 17] or/and CHROMagar [10, 18, 22, 23]. Identification of clinical isolates of different *Candida* species was also detected by either quantitative real-time PCR [19, 21], random amplified polymorphic DNA [22] or ATB ID 32 [18]. In all cases, the patients had not taken antibiotics, at least 2 months before taking the samples.

These studies analysed 626 patients, 361 with PI (57.7%) and 265 without PI (42.3%), whose mean age varied between 53 and 67 years. Data about gender was available in 5 studies [10, 18, 19, 21, 23], from which 20.3% were women (38 with PI and 33 without PI) and 79.7% (162 with PI and 117 without PI) men. Curiously, two articles from Saudi Arabia did not include female patients [10, 23]. In total, 737 patients wearing dental implants were investigated, 400 (54.3%) with peri-implantitis and 337 (45.7%) without PI (Table 1).

Only one study did not find *Candida* in the sulcular fluid [17]. The rest of the studies recognized a bigger presence of the fungi in the implants with PI (range, 3–76.7%), in contrast to healthy ones (range, 9–50%) [15, 16, 18, 19, 21–23]. Dentate patients also had more *Candida* in their implants than edentulous ones [16, 19]. Fungal colonization was observed only in dental implants with PI in three studies [15, 16, 18].

*C. albicans* was the most isolated species, followed by *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida boidinii*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei* and *Candida lusitaniae* (Table 2). Rosenberg et al. [15] did not indicate the species of *Candida*. Most of the authors reported presence of *C. albicans*, as well as *C. boidinii*, *C. dubliniensis*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*

and *C. lusitaniae* [10, 21–23]. None of the authors stated if these were pure or polifungal *Candida* biofilms [10, 21–23]. *C. albicans* alone was observed in three studies [16–18].

### Risk of bias in individual studies

After applying modified NOS assessment, 22.2% of the studies revealed 9 stars, 44.5% of them 8 and 33.3% of them 7 (Table 3). Overall, risk of bias was low.

### Clinical and microbiological characteristics of the excluded studies

The six articles excluded in this review analysed the presence of *Candida* in the sulcular fluid surrounding 362 dental implants [2, 23–27]. In most reports, *C. albicans* was isolated [2, 23, 25, 26]; however, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *Candida kefyr* and *Candida norvegensis* were also observed [20, 24, 26] (Table 4). The presence of *Candida* was variable, affecting between 10 and 71% of the implants. The study of Peñarrocha et al. [24] was the only one in which no *Candida* was observed in the implants investigated. This absence of *Candida* colonization might be related to the small sample size (20 patients) and to the fact that they look for the presence of *C. albicans* and no other species of *Candida*.

Gomes et al. [26] described that the quantity of *Candida* was bigger at 8 months was higher than that observed at 4 months after implant placement. Mencio et al. [2] only observed the presence of *C. albicans* in implants with cemented implant-abutment connections but not in those with screwed implant-abutment connections. In addition, Kilic et al. [23] found more *Candida* colonization in patients with bar-retained overdentures (25%) than in those with locator-retained overdentures (19%) (Table 3).

**Table 2** Microbiological findings of the included studies. Species of *Candida*

Authors and year	<i>Candida</i> presence (%)			Species of <i>Candida</i>
	Total	PI	Healthy	
Rosenberg et al. 1991 [15]	32	32	0	-
Leonhardt et al. 1999 [16]	27	27	0	<i>C. albicans</i>
Albertini et al. 2015 [18]	3	3	-	<i>C. albicans</i>
Canullo et al. 2015 [19]	13.5	16.9	15.9%	<i>C. albicans</i>
Schwarz et al. 2015 [20]	12.9	15.8	10	<i>C. albicans</i> , <i>C. boidinii</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Bertone et al. 2016 [21]	51.5	53	50	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. guilliermondii</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. lusitaniae</i>
Alrabiah et al. 2019 [10]	44.5	76.7	12.2	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>
Alsahhaf et al. 2019 [22]	43	76.2	9.8	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. parapsilosis</i>

PI peri-implantitis

**Table 3** Quality assessment of the included studies. NOS tool

Authors, year	Type of study	Newcastle-Ottawa Scale (NOS)		
		Selection	Comparison	Exposure/outcome
Rosenberg et al. 1991 [15]	Case-control	★★	★★	★★★
Leonhardt et al. 1999 [16]	Case-control	★★	★★	★★★
Listgarten et al. 1999 [17]	Cohort	★★★	★★	★★★
Albertini et al. 2015 [18]	Cohort	★★★	★★	★★★
Canullo et al. 2015 [19]	Case-control	★★	★★	★★★
Schwarz et al. 2015 [20]	Case-control	★★★	★★	★★★
Bertone et al. 2016 [21]	Cohort	★★★	★★	★★★
Alrabiah et al. 2019 [10]	Case-control	★★★★	★★	★★★
Alsahhaf et al. 2019 [22]	Case-control	★★★★	★★	★★★

## Discussion

*Candida* is a heterogeneous fungal genus composed by more than 150 species. Although some species of *Candida* coexist as human commensals, they can cause superficial and systemic infections under certain circumstances [28]. Most candidiasis are caused by *C. albicans*, but in the recent years other non-*C. albicans* species have manifested a pathogenic capacity. Among the most frequently isolated from clinical specimens are *Candida glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* [29].

The pathogenicity of *Candida* responds to a set of virulence factors, including dimorphism, secretion of hydrolytic enzymes (proteases, lipases and haemolysins) and adhesion and biofilm formation on the mucous epithelium and on medical devices [30, 31]. Formation of biofilms is a complex sequential process that depends on the invasive agent and the structure on which it is hosted [32]. Yeast colonization of biotic and abiotic surfaces is the first step in the development of biofilms, followed by cell division and microcolonies generation that contribute to the maturation of a biofilm characterized by the presence of hyphae and yeasts (sessile cells) embedded in an extracellular matrix and, finally, the detachment of some of these cells [33]. The release of planktonic cells into the environment allows them to colonize new surfaces and to develop new foci of candidiasis.

Because the diagnostic criteria of the peri-implant diseases have been in constant change, the diagnosis of peri-implantitis in the included studies have differed from one to another, due to being published over a long period of time, from 1991 to 2020. Yet most of the reviewed studies collected data about bleeding and/or suppuration on probing, probing depth and radiographic bone loss. Moreover, implant mobility and presence of keratinized mucosa was evaluated in three studies [15, 16, 20, 21]. For all these reasons, although it cannot be guaranteed that all the implants studied in this work have been correctly categorized as healthy or diseased, the margin of error could not be very wide [5, 34, 35]. In regards to the risk factor of PI, none of the studies excluded patients with history of periodontitis and two discarded smokers [10, 22]. Still, only one of the nine selected articles did not state whether they found *Candida* or not [17].

According to the included studies of this review, implants with peri-implantitis (range, 3–76.7%) had a higher presence of *Candida* than those without peri-implantitis (range, 9–50%). However, we do not know why prevalence of *Candida* was significantly bigger in the studies with individuals from Saudi Arabia [10, 22]. Since fungal assessment and sample size were similar to other studies [16, 18], we believe these particular results may be related to special geographical and sociocultural

**Table 4** Clinical data and microbiological findings of the excluded studies\*

Authors and year (country)	Patients (implants)	Isolation of <i>Candida</i> from clinical specimens	
		%	Species
Kilic et al. 2014 (Turkey) [23]	37 (37)	71	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. kefyr</i> , <i>C. norvegensis</i>
Peñarrocha et al. 2015 (Spain) [24]	20 (43)	0	-
Canullo et al. 2015 (Italy) [25]	40 (80)	15	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Gomes et al. 2017 (Brazil) [26]	14 (60)	-	<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i>
Mencio et al. 2017 (Italy) [2]	20 (50)	10	<i>C. albicans</i>
Ju et al. 2019 (South Korea) [27]	92 (92)	13	-

\*These articles were excluded due to the absence of any peri-implant diagnostic criteria



factors, such as diet, and the fact that these authors excluded female patients and smokers [10, 22].

Moreover, the fact that 10–71% of implants, regardless of peri-implantitis, showed the presence of this fungus demonstrates that colonization of *Candida* in the peri-implant environment is independent of the disease. Also, because a slightly higher number of patients with bar-retained overdentures had *Candida*, in contrast to locator-retained overdentures, time and hygiene of implants might also be important factors of fungal colonization.

Schwarz et al. [20] were the sole authors to state a direct relationship between *Candida* and other microorganisms. Thereby, from three implants with PI, *C. boidinii* was isolated alongside *Mycoplasma salivarum*, *Veillonella parvula*, *Porphyromonas gingivalis*, *Parvimonas micra* and *Tannerella forsythia* in one of them, and in the other two, *C. albicans* was also found with *V. parvula*, *T. forsythia*, *M. salivarum*, *P. gingivalis* and *P. micra*. On the other hand, *C. dubliniensis* was accompanied by *M. salivarum*, *V. parvula*, *Staphylococcus aureus*, *P. micra* and *T. forsythia* in one healthy implant. The latter species of *Candida*, *C. dubliniensis* has been isolated from patients suffering from different oral pathologies, resembling *C. albicans* in many virulence factors including hypha formation and hydrolytic enzyme production [36, 37]. In this context, *Candida* colonization could be linked to the presence of other periodontopathogens, like *T. forsythia*, *P. micra* or *P. gingivalis*. Although the exact role of *Candida* in the beginning of the peri-implant disease is unknown, we believe that this fungus could play an important function in the latter stages of PI, when the bacterial micro-environment is already established, as demonstrated in experimental studies [38].

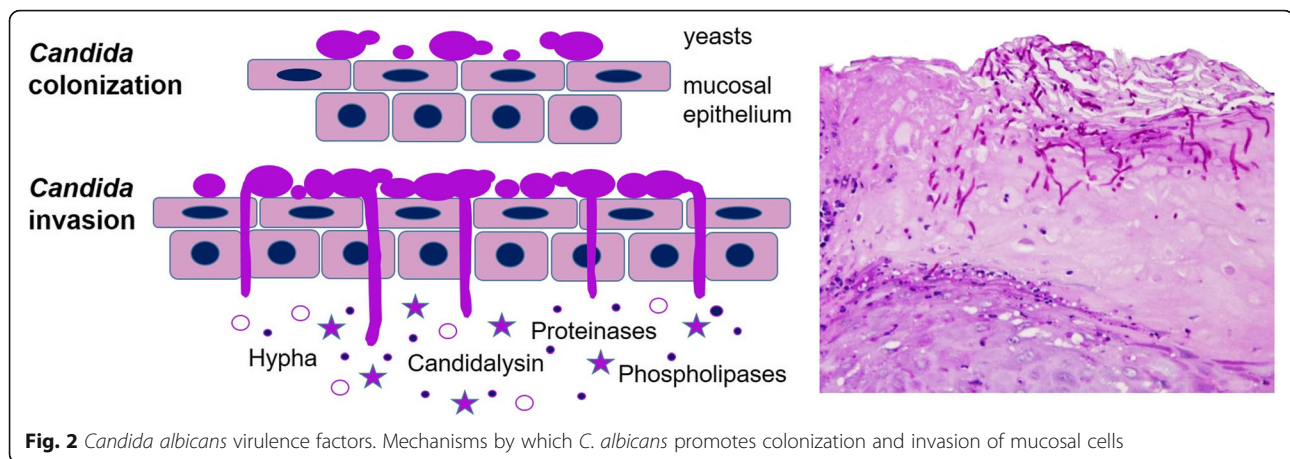
Knowledge of the involvement of *Candida* infection in disorders of bone remodelling is limited, but it has been described in *Candida* arthritis and osteomyelitis [39, 40], nosological entities described very rarely in the jaws [41, 42]. *Candida* arthritis and osteomyelitis develop by haematogenous invasion, mainly in patients with immunodeficiency, being *C. albicans* is usually the most frequently isolated, although *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* has also been isolated [40]. As in the latter processes, *Candida* would act as a modifying agent in chronic inflammation around dental implants that activates the bone resorption response.

Anaerobiosis, as occurs in peri-implant pockets, can promote the virulence of *C. albicans*, increasing the activity of secreted aspartyl proteinases (Sap) [43]. These Sap proteins are associated to *Candida* adherence, tissue damage and modulation of immune response, maintaining inflammatory stimuli that attract other periodontopathogens [44, 45]. This role of Saps is important because the ability to form thick biofilms is easier for *C.*

*albicans*, both under aerobic and anaerobic conditions, whereas for the rest of the species of *Candida*, growth is much greater only under aerobic conditions [46]. *C. albicans* hyphae secrete candidalysin, a 31-amino-acid peptide toxin that damages the epithelial cells and has an immunomodulatory capacity by binding to epidermal growth factor receptor (ErbB1 or Her1) [47]. Yeast and hyphal morphologies are present during asymptomatic *C. albicans* colonization of human mucosal surfaces. However, hypha formation can lead to candidalysin secretion, tissue damage and immune modulation (Fig. 2). Furthermore, *C. albicans* 95-kDa metallopeptidase, localized in cell wall, owns the capacity to destroy different elements of the peri-implant soft and hard tissues like type I collagen (connective tissue, alveolar bone and cement), type IV collagen (basement membrane of the mucosa), fibronectin (periodontal ligament) and laminin (basement membrane of the mucosa and cement) [48–50].

Interestingly, one study [22] pointed that patients with dental implants in which *Candida* was isolated, also had a higher presence of these fungi at the buccal, lingual and palatal mucosa. Although this study did not differentiate between implants with and without PI, it evidences the existence of an oral reservoir for *Candida* that facilitates the entry of this fungus into the peri-implant sulcus.

This systematic review has limitations. First, only nine studies analysed the presence of *Candida* in patients with peri-implantitis including very heterogeneous samples (range, 20–126 studied specimens). Second, few studies reported the number of *Candida* colony-forming units (CFU), which is a fundamental data for the mycological analysis [9, 51]. Alrabiah et al. [10] showed significant differences in the quantity of *Candida* between specimens from patients suffering PI (3147.54 CFU/mL) and from patients without PI ( $496.68 \pm 100.2$  CFU/mL). These findings are similar to those found by Alsahhaf et al. [22] (2316.26 vs 177.6 CFU/ml). Third, it was impossible to analyse the differences of *Candida* in patients with PI, regarding the type, composition, design and surface of the implants, because only Leonhardt et al. [16], said that their implants were Nobel Biocare AB (Gothenburg, Sweden). We are convinced of the importance of studying the implant characteristics, since they can be strongly related to colonization and infection, according to how they allow *Candida* adherence. There is a strong association between implant properties and microbial adhesion, titanium being one of the most resistant to *Candida* colonization and biofilm development [8]. Moreover, there is a considerable heterogeneity of the selected studies regarding the microbial methods and study design then results obtained from different microbiological methods did not allow for a direct comparison.



**Fig. 2** *Candida albicans* virulence factors. Mechanisms by which *C. albicans* promotes colonization and invasion of mucosal cells

## Conclusions

In summary, *Candida* is a common inhabitant of the peri-implant sulcular sulcus microbial environment, both in healthy implants and in those from people suffering from PI. However, *Candida* presence is more common in peri-implantitis. This presence and the *Candida* concentrations in the peri-implant tissue can be related to the lapse of time dental implants have been in the oral cavity. In addition, the quantity of *Candida* in the sulcular fluid surrounding the implants might rely on the presence of other periodontopathogens, such as *V. parvula*, *T. forsythia*, *M. salivarium*, *P. gingivalis* or *P. micra*. Although, *C. albicans*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis* are the most common species in peri-implantitis, others have also been identified, such as *C. dubliniensis*, *C. boidinii*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* and *C. lusitaniae*, but in a very low frequency. Better-designed studies are needed, with larger patient samples, to unravel whether there is a relevant role for *Candida* in the etiopathogenesis of peri-implantitis and dental implant failure.

## Acknowledgements

Not applicable

## Authors' contributions

ILIM made substantial contributions to the conception and design of the work and acquisition, analysis, and interpretation of data. ACCG contributed to the conception of the work and of data. GQA contributed to interpretation of data and substantively revised the draft. JMAU made substantial contributions to the conception of the work, interpretation of data, and substantively revised the draft. The authors read and approved the final manuscript.

## Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial or not-for-profit sectors. The authors have no conflict of interest related to the study.

## Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

## Declarations

### Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

### Consent for publication

Not applicable.

### Competing interests

Irene Lafuente-Ibáñez de Mendoza, Amaia Cayero-Garay, Guillermo Quindós-Andrés and José Manuel Aguirre-Urizar declare that they have no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Department of Stomatology II, University of the Basque Country (UPV/EHU), Barrio Sarriena s/n, 48940 Leioa, Vizcaya, Spain. <sup>2</sup>Department of Immunology, Microbiology and Parasitology, University of the Basque Country (UPV/EHU), Leioa, Vizcaya, Spain.

Received: 9 February 2021 Accepted: 30 March 2021

Published online: 17 June 2021

## References

- Karoussis IK, Salvi GE, Heitz-Mayfield LJ, Brägger U, Hämmerle CH, Lang NP. Long-term implant prognosis in patients with and without a history of chronic periodontitis: a 10-year prospective cohort study of the ITI® Dental Implant System. *Clin Oral Implants Res.* 2003;14(3):329–39. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.000.00934.x>.
- Mencio F, De Angelis F, Papi P, Rosella D, Pompa G, Di Carlo S. A randomized clinical trial about presence of pathogenic microflora and risk of peri-implantitis: comparison of two different types of implant-abutment connections. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(7):1443–51.
- Schwarz F, Derks J, Monje A, Wang HL. Peri-implantitis. *J Clin Periodontol.* 2018;45:S246–66. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12954>.
- Berglundh T, Zitzmann NU, Donati M. Are peri-implantitis lesions different from periodontitis lesions? *J Clin Periodontol.* 2011;38:188–202. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01672.x>.
- Persson GR, Renvert S. Cluster of bacteria associated with peri-implantitis. *Clin Implant Dent Rel Res.* 2014;16(6):783–93. <https://doi.org/10.1111/cid.12052>.
- Bürgers R, Hahnel S, Reichert TE, Rosentritt M, Behr M, Gerlach T, et al. Adhesion of *Candida albicans* to various dental implant surfaces and the influence of salivary pellicle proteins. *Acta Biomater.* 2010;6(6):2307–13. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.11.003>.
- Cobo F, Rodríguez-Granger J, Sampedro A, Aliaga-Martínez L, Navarro-Marí JM. *Candida* prosthetic joint infection. A review of treatment methods. *J Bone Joint Inf.* 2017;2(2):114–21. <https://doi.org/10.7150/bji.17699>.
- De-la-Pinta I, Cobos M, Ibarretxe J, Montoya E, Eraso E, Guraya T, et al. Effect of biomaterials hydrophobicity and roughness on biofilm development.

- J Mater Sci Mater Med. 2019;30(7):77. <https://doi.org/10.1007/s10856-019-6281-3>.
9. Aguirre-Urizar JM. Candidiasis orales. *Rev Iberoam Micol.* 2002;19(1):17–21.
  10. Alrabiah M, Alshagroud RS, Alsahhaf A, Almojalay SA, Abduljabbar T, Javed F. Presence of *Candida* species in the subgingival oral biofilm of patients with peri-implantitis. *Clin Implants Dent Relat Res.* 2019;21(4):781–5.
  11. Urzúa B, Hermosilla G, Gamonal J, Morales-Bozo I, Canals M, Barahona, et al. Yeast diversity in the oral microbiota of subjects with periodontitis: *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* colonize the periodontal pockets. *Sabouraudia.* 2008;46(8):783–93. <https://doi.org/10.1080/13693780802060899>.
  12. De la Torre J, Quindós G, Marcos-Arias C, Marichalar-Mendia X, Gainza ML, Eraso E, et al. Oral *Candida* colonization in patients with chronic periodontitis. Is there any relationship? *Rev Iberoam Micol.* 2018;35(3):134–9. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2018.03.005>.
  13. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses (2015). The PRISMA statement. *An Int Med.* 2009;151(4):264–9. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-151-4-200908180-00135>.
  14. Wells GA, Tugwell P, O'Connell D, Welch V, Peterson J, Shea B et al. The Newcastle-Ottawa Scale (NOS) for assessing the quality of nonrandomized studies in meta-analyses (2015). Retrieved from [http://www.ohri.ca/programs/clinical\\_epidemiology/oxford.asp](http://www.ohri.ca/programs/clinical_epidemiology/oxford.asp)
  15. Rosenberg ES, Torosian JP, Slots J. Microbial differences in 2 clinically distinct types of failures of osseointegrated implants. *Clin Oral Implants Res.* 1991;2(3):135–44. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1991.020306.x>.
  16. Leonhardt Å, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res.* 1999;10(5):339–45. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0501.1999.100501.x>.
  17. Listgarten MA, Lai CH. Comparative microbiological characteristics of failing implants and periodontally diseased teeth. *J Periodontol.* 1999;70(4):431–7. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.4.431>.
  18. Albertini M, López-Cerero L, O'Sullivan MG, Chereguini CF, Ballesta S, Ríos, et al. Assessment of periodontal and opportunistic flora in patients with peri-implantitis. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(8):937–41. <https://doi.org/10.1111/clr.12387>.
  19. Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Covani U, Rossetti PHO. Microbiologic and clinical findings of implants in healthy condition and with peri-implantitis. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2015;30(4):834–42. <https://doi.org/10.11607/jomi.3947>.
  20. Canullo L, Peñarrocha-Oltra D, Soldini C, Mazzocco F, Penarrocha M, Covani U. Microbiological assessment of the implant-abutment interface in different connections: cross-sectional study after 5 years of functional loading. *Clin Oral Implants Res.* 2015;26(4):426–34. <https://doi.org/10.1111/clr.12383>.
  21. Schwarz F, Becker K, Rahn S, Hegewald A, Pfeiffer K, Henrich B. Real-time PCR analysis of fungal organisms and bacterial species at peri-implantitis sites. *Int J Implant Dent.* 2015;1(1):9. <https://doi.org/10.1186/s40729-015-0010-6>.
  22. Bertone AM, Rosa AC, Natri N, Santillán HD, Ariza Y, Iovannitti CA, et al. Genetic-relatedness of peri-implants and buccal *Candida albicans* isolates determined by RAPD-PCR. *Acta Odontol Lat.* 2016;29(3):197–205.
  23. Alsahhaf A, Al-Aali KA, Alshagroud RS, Alshiddi IF, Alrahlah A, Abduljabbar T, et al. Comparison of yeasts species in the subgingival oral biofilm of individuals with type 2 diabetes and peri-implantitis and individuals with peri-implantitis without diabetes. *J Periodontol.* 2019;90(12):1383–9. <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0091>.
  24. Kilic K, Koc AN, Tekinsen FF, Yildiz P, Kilic D, Zararsiz G, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in bar-and locator-retained overdentures. *J Implantol.* 2014;40(5):549–56. <https://doi.org/10.1563/AID-JOI-D-12-00048>.
  25. Peñarrocha-Oltra D, Rossetti PH, Covani U, Galluccio F, Canullo L. Microbial leakage at the implant-abutment connection due to implant insertion maneuvers: cross-sectional study 5 years postloading in healthy patients. *J Oral Implantol.* 2015;41(6):e292–6. <https://doi.org/10.1563/aa-id-joi-d-14-00235>.
  26. Gomes JA, Sartori IA, Able FB, de Oliveira Silva TS, do Nascimento C. Microbiological and clinical outcomes of fixed complete-arch mandibular prostheses supported by immediate implants in individuals with history of chronic periodontitis. *Clin Oral Implants Res.* 2017;28(6):734–41. <https://doi.org/10.1111/clr.12871>.
  27. Ju HM, Ahn YW, Jeong SH, Jeon HM, Kim KH, Song BS, et al. Characteristics of patients who perceive dental treatment as a cause of oral mucosal lesions. *J Oral Sci.* 2019;61(3):468–74. <https://doi.org/10.2334/josnusd.18-0292>.
  28. Araújo D, Henriques M, Silva S. Portrait of *Candida* species biofilm regulatory network genes. *Trend Microbiol.* 2017;25(1):62–75. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.09.004>.
  29. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. *Int Microbiol.* 2018; 21(3):107–17. <https://doi.org/10.1007/s10123-018-0014-1>.
  30. Berman J, Sudbery PE. *Candida albicans*: a molecular revolution built on lessons from budding yeast. *Nat Rev Genet.* 2002;3(12):918–30. <https://doi.org/10.1038/nrg948>.
  31. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119–28. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>.
  32. Nobile CJ, Fox EP, Nett JE, Sorrells TR, Mitrovich QM, Hernday AD, et al. A recently evolved transcriptional network controls biofilm development in *Candida albicans*. *Cell.* 2012;148(1-2):126–38. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.10.048>.
  33. Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol.* 2012;9(2):109–18.
  34. Kumar PS, Mason MR, Brooker MR, O'Brien K. Pyrosequencing reveals unique microbial signatures associated with healthy and failing dental implants. *J Clin Periodontol.* 2012;39(5):425–33. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01856.x>.
  35. Carcuac O, Berglundh T. Composition of human peri-implantitis and periodontitis lesions. *J Dent Res.* 2014;93(11):1083–8. <https://doi.org/10.1177/0022034514551754>.
  36. Gutiérrez J, Morales P, González MA, Quindós G. *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol.* 2002;42(3):207–27. [https://doi.org/10.1002/1521-4028\(200206\)42:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-4028(200206)42:3<207::AID-JOBM207>3.0.CO;2-C).
  37. Sahand IH, Maza JL, Eraso E, Montejo M, Moragues MD, Aguirre JM, et al. Evaluation of CHROM-Pal medium for the isolation and direct identification of *Candida dubliniensis* in primary cultures from the oral cavity. *J Med Microbiol.* 2009;58:1437–42.
  38. Cavalcanti YW, Wilson M, Lewis M, Del-Bel-Cury AA, da Silva WJ, Williams DW. Modulation of *Candida albicans* virulence by bacterial biofilms on titanium surfaces. *Biofouling.* 2016;32(2):123–34. <https://doi.org/10.1080/08927014.2015.1125472>.
  39. Slenker AK, Keith SW, Horn DL. Two hundred and eleven cases of *Candida* osteomyelitis: 17 case reports and a review of the literature. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;73(1):89–93. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2012.02.004>.
  40. Gamaletsou MN, Rammaert B, Bueno MA, Sipsas NV, Moriyama B, Kontoyiannis D, et al. *Candida* arthritis: analysis of 112 pediatric and adult cases. *Open Forum Infect Dis.* 2016;3(1):ofv207. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofv207>.
  41. Attie MD, Anderson IA, Portnof J. Mandibular osteomyelitis associated with *Candida albicans* in marijuana and heroin abusers. *Ann Maxillofac Surg.* 2018;8(2):355–7. [https://doi.org/10.4103/ams.ams\\_83\\_18](https://doi.org/10.4103/ams.ams_83_18).
  42. Kaushal D, Sharma A, Kesarwani A, Kalita JM. Chronic *Candida* osteomyelitis of hard palate and nose: a diagnostic quandary. *Med Mycol Case Rep.* 2019; 24:1–4. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2019.01.003>.
  43. Rosa EAR, Rached RN, Ignácio SA, Rosa RT, da Silva WJ, Yau JYY, et al. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 2008;57(10):1277–81. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/001107-0>.
  44. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003; 67(3):400–28. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.3.400-428.2003>.
  45. Sardi JCO, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Giannini MM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol.* 2008; 62(1):10–24.
  46. Thein ZM, Samaranyake YH, Samaranyake LP. In vitro biofilm formation of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species under dynamic and anaerobic conditions. *Arch Oral Biol.* 2007;52(8):761–7. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2007.01.009>.
  47. Naglik JR, Gaffen SL, Hube B. Candidalysin: Discovery and function in *Candida albicans* infections. *Curr Opin Microbiol.* 2019;52:100–9. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.06.002>.
  48. Rodier MH, El Moudni B, Kauffmann-Lacroix C, Daniault G, Jacquemin JL. A *Candida albicans* metalloproteinase degrades constitutive proteins of



extracellular matrix. *FEMS Microbiol Let.* 1999;177(2):205–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13733.x>.

49. Embery G, Waddington RJ, Hall RC, Last KS. Connective tissue elements as diagnostic aids in periodontology. *Periodontol* 2000. 2000;24(1):193–214.
50. Canabarro A, Valle C, Farias MR, Santos FB, Lazera M, Wanke B. Association of subgingival colonization of *Candida albicans* and other yeasts with severity of chronic periodontitis. *J Periodontol Res.* 2013;48(4):428–32. <https://doi.org/10.1111/jre.12022>.
51. Tooyama H, Matsumoto T, Hayashi K, Kurashina K, Kurita H, Uchida M, et al. *Candida* concentrations determined following concentrated oral rinse culture reflect clinical oral signs. *BMC Oral Health.* 2015;15(1):150. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0138-z>.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Submit your manuscript to a SpringerOpen<sup>®</sup> journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

---

Submit your next manuscript at ► [springeropen.com](https://www.springeropen.com)

---

9.3. Arrayean sartutako proteina ez-espezifikoen SNPak: Taldekako analisi konparatiboa.

Gen-SNP	Genotipoa	Ikerketa taldea: n (%)		p
		KOT	KAT	
LTF rs1034383	AA	15,4 (12)	18,9 (14)	0,648
	AG	41 (32)	44,6 (33)	
	GG	43,6 (34)	36,5 (27)	
LTF rs17078864	CC	84,8 (67)	73 (54)	0,185
	CT	13,9 (11)	25,7 (19)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	
LTF rs12629300	AA	77,2 (61)	68,9 (51)	0,504
	AT	21,5 (17)	29,7 (22)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	
LTF rs17141154	AA	1,3 (1)	2,7 (2)	0,103
	AG	15,2 (12)	28,4 (21)	
	GG	83,5 (66)	68,9 (51)	
LTF rs6441990	CC	59,2 (45)	51,4 (38)	0,601
	CG	32,9 (25)	40,5 (30)	
	GG	7,9 (6)	8,1 (6)	
LTF rs6441995	CC	58,2 (46)	48,6 (36)	0,472
	CT	34,2 (27)	40,5 (30)	
	TT	7,6 (6)	10,8 (8)	
LTF rs7629657	CC	82,3 (65)	86,5 (64)	0,751
	CT	16,5 (13)	12,2 (9)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	
LTF rs9862186	AA	72,7 (56)	58,1 (43)	0,157
	AG	24,7 (19)	36,5 (27)	
	GG	2,6 (2)	5,4 (4)	
ADR $\alpha$ 1 $\alpha$ rs1383914	AA	32,4 (24)	31,9 (23)	0,958
	AG	50 (37)	48,6 (35)	
	GG	17,6 (13)	19,4 (14)	
ADR $\alpha$ 1 $\alpha$ rs1048101	CC	22,8 (18)	18,9 (14)	0,814
	CT	49,4 (39)	50 (37)	
	TT	27,8 (22)	31,1 (23)	
ADR $\beta$ 2 rs1042713	AA	12,7 (10)	12,2 (9)	0,987
	AG	49,4 (39)	48,6 (36)	
	GG	38 (30)	39,2 (29)	
CHST11 rs835487	AA	38 (30)	41,1 (30)	0,513
	AG	48,1 (38)	39,7 (29)	
	GG	13,9 (11)	19,2 (14)	
SNAP25 rs3746544	AA	30,8 (24)	44,6 (33)	0,173
	AC	50 (39)	43,2 (32)	
	CC	19,2 (15)	12,2 (9)	
DRD2 rs6277	CC	16,5 (13)	16,2 (12)	0,939
	CT	40,5 (32)	43,2 (32)	
	TT	43 (34)	40,5 (30)	
DROSHA rs7719666	CC	38 (30)	39,2 (29)	0,876
	CT	45,6 (36)	41,9 (31)	
	TT	16,5 (13)	18,9 (14)	
DROSHA rs3805500	CC	14,1 (11)	12,2 (9)	0,497
	CT	50 (39)	59,5 (44)	
	TT	35,9 (28)	28,4 (21)	
SMC1B rs3747238	CC	20,3 (16)	14,9 (11)	0,587
	CT	50,6 (40)	50 (37)	
	TT	29,1 (23)	35,1 (26)	
TRPV2 rs395357	CC	24,1 (19)	25,7 (19)	0,964
	CT	50,6 (40)	48,6 (36)	
	TT	25,3 (20)	25,7 (19)	
HTR2A rs6311	CC	25,3 (20)	39,2 (29)	0,132
	CT	50,6 (40)	36,5 (27)	
	TT	24,1 (19)	24,3 (18)	
POLR1C rs699937	CC	50,6 (40)	35,1 (26)	0,125
	CT	41,8 (33)	51,4 (38)	
	TT	7,6 (6)	13,5 (10)	

SCN9α rs12620053	AA	30,4 (24)	35,1 (26)	0,776
	AC	53,2 (42)	51,4 (38)	
	CC	16,5 (13)	13,5 (10)	
SCN9α rs7607967	AA	20,3 (16)	20,3 (15)	0,55
	AG	36,7 (29)	44,6 (33)	
	GG	43 (34)	35,1 (26)	
SCN9α rs13017637	CC	31,6 (25)	28,4 (21)	0,874
	CT	49,4 (39)	50 (37)	
	TT	19 (15)	21,6 (16)	
SCN9α rs4453709	AA	35,4 (28)	32,4 (24)	0,766
	AT	45,6 (36)	51,4 (38)	
	TT	19 (15)	16,2 (12)	
GDF5 rs143383	CC	16,5 (13)	14,9 (11)	0,911
	CT	50,6 (40)	54,1 (40)	
	TT	32,9 (26)	31,1 (23)	
LOC107986766 rs2097903	AA	26,6 (21)	39,2 (29)	0,233
	AT	53,2 (42)	41,9 (31)	
	TT	20,3 (16)	18,9 (14)	
SSTR2 rs7210080	CC	8,9 (7)	9,5 (7)	0,577
	CT	32,9 (26)	40,5 (30)	
	TT	58,2 (46)	50 (37)	
CHST11 rs835487	AA	38 (30)	41,1 (30)	0,513
	AG	48,1 (38)	39,7 (29)	
	GG	13,9 (11)	19,2 (14)	
MTRR rs1801394	AA	31,6 (25)	23 (17)	0,351
	AG	44,3 (35)	55,4 (41)	
	GG	24,1 (19)	21,6 (16)	
ESR1 rs2234693	CC	26,6 (21)	28,4 (21)	0,377
	CT	48,1 (38)	55,4 (41)	
	TT	25,3 (20)	16,2 (12)	
ESR1 rs1643821	CC	23,1 (18)	26,8 (19)	0,871
	CT	51,3 (40)	49,3 (35)	
	TT	25,6 (20)	23,9 (17)	
GFRα1 rs3781545	AA	3,8 (3)	2,7 (2)	0,86
	AG	27,8 (22)	31,1 (23)	
	GG	68,4 (54)	66,2 (49)	
TGFβ1 rs1800469	CC	34 (46,6)	36 (49,3)	0,53
	CT	30 (41,1)	32 (43,8)	
	TT	9 (12,3)	5 (6,9)	
KCNS1 rs734784	AA	25,3 (20)	23 (17)	0,137
	AG	48,1 (38)	62,2 (46)	
	GG	26,6 (21)	14,9 (11)	
ENPP1 rs858339	AA	12,7 (10)	8,1 (6)	0,635
	AT	40,5 (32)	44,6 (33)	
	TT	46,8 (37)	47,3 (35)	
BRAF rs10487888	AA	22,8 (18)	32,4 (24)	0,303
	AG	51,9 (41)	50 (37)	
	GG	25,3 (20)	17,6 (13)	
SMAD3 rs12901499	AA	19 (15)	28,4 (21)	0,209
	AG	46,8 (37)	48,6 (36)	
	GG	34,2 (27)	23 (17)	
RXP2 rs1531554	CC	29,5 (23)	35,1 (26)	0,757
	CT	52,6 (41)	48,6 (36)	
	TT	17,9 (14)	16,2 (12)	
MTHFR rs2236225	CC	31,6 (25)	32,4 (24)	0,789
	CT	51,9 (41)	47,3 (35)	
	TT	16,5 (13)	20,3 (15)	
MTHFR rs1801131	AA	46,2 (36)	54,1 (40)	0,575
	AC	46,2 (36)	37,8 (28)	
	CC	7,7 (6)	8,1 (6)	
UPP2 rs7565931	CC	1,3 (1)	2,7 (2)	0,561
	CG	29,1 (23)	35,1 (26)	
	GG	69,6 (55)	62,2 (46)	
PRKCa	CC	38 (30)	39,2 (29)	0,763

rs887797	CT	50,6 (40)	45,9 (34)	
	TT	11,4 (9)	14,9 (11)	
JAK2 rs2274471	CC	9 (7)	10,8 (8)	0,812
	CT	38,5 (30)	33,8 (25)	
	TT	52,6 (41)	55,4 (41)	
RGS7 rs6689169	AA	77,2 (61)	82,2 (60)	0,52
	AG	21,5 (17)	17,8 (13)	
	GG	1,3 (1)	0 (0)	
RGS13 rs3795617	AA	22,8 (18)	20,3 (15)	0,812
	AG	48,1 (38)	45,9 (34)	
	GG	29,1 (23)	33,8 (25)	
SUFU rs11594179	CC	53,2 (42)	51,4 (38)	0,513
	CT	35,4 (28)	41,9 (31)	
	TT	11,4 (9)	6,8 (5)	
COMT rs165599	AA	49,4 (39)	45,9 (34)	0,792
	AG	40,5 (32)	40,5 (30)	
	GG	10,1 (8)	13,5 (10)	
COMT rs4680	AA	27,8 (22)	28,4 (21)	0,796
	AG	41,8 (33)	45,9 (34)	
	GG	30,4 (24)	25,7 (19)	
COL1 $\alpha$ 1 rs1800012	GG	53,8 (42)	60,3 (44)	0,552
	GT	38,5 (30)	30,1 (22)	
	TT	7,7 (6)	9,6 (7)	
SHMT1 rs1979277	AA	13,9 (11)	5,4 (4)	0,125
	AG	40,5 (32)	36,5 (27)	
	GG	45,6 (36)	58,1 (43)	
LRP1 rs11172113	CC	12,7 (10)	13,5 (10)	0,517
	CT	40,5 (32)	48,6 (36)	
	TT	46,8 (37)	37,8 (28)	
TNKS1BP rs11602501	AA	22,4 (17)	31,5 (23)	0,369
	AC	43,4 (33)	42,5 (31)	
	CC	34,2 (26)	26 (19)	
TSC1 rs3827665	CC	87,3 (69)	78,4 (58)	0,318
	CT	11,4 (9)	20,3 (15)	
	TT	1,3 (1)	1,4 (1)	

**9.4. Hantura-erantzuna eta hezur-birmoldaketaren proteinen SNPak. Analisia arrisku-faktoreen arabera: Periodontitis aurrekaria.**

Gen-SNP	Genotipoa	KAT		p	KOT		p
		Periodontitis aurrekaria: n (%)			Periodontitis aurrekaria: n (%)		
		Ez	Bai		Ez	Bai	
GBP1 rs7911	CC	7 (18,42)	4 (21,05)	0,61	7 (13,73)	5 (17,86)	0,88
	CT	15 (39,47)	5 (26,32)		30 (58,82)	16 (57,14)	
	TT	16 (42,11)	10 (52,63)		14 (27,45)	7 (25)	
IL1 $\beta$ rs16944	AA	5 (13,16)	2 (10,53)	0,96	4 (7,84)	2 (7,14)	0,12
	AG	17 (44,74)	9 (47,37)		28 (54,9)	9 (32,14)	
	GG	16 (42,11)	8 (42,11)		19 (37,25)	17 (60,71)	
IL6 rs1800795	CC	6 (15,79)	2 (11,11)	0,52	3 (6)	3 (10,71)	0,76
	CG	17 (44,74)	11 (61,11)		28 (56)	15 (53,57)	
	GG	15 (39,47)	5 (27,78)		19 (38)	10 (35,71)	
IL10 rs1800896	AA	12 (31,58)	8 (42,11)	0,46	20 (39,22)	13 (46,43)	0,40
	AG	20 (52,63)	10 (52,63)		24 (47,06)	9 (32,14)	
	GG	6 (15,79)	1 (5,26)		7 (13,73)	6 (21,43)	
BMP4 rs17563	CC	12 (31,58)	4 (21,05)	0,20	10 (19,61)	6 (21,43)	0,97
	CT	20 (52,63)	8 (42,11)		27 (52,94)	14 (50)	
	TT	6 (15,79)	7 (36,84)		14 (27,45)	8 (28,57)	
BRINP3 rs1935881	AA	20 (52,63)	11 (57,89)	0,83	18 (35,29)	8 (28,57)	0,83
	AG	15 (39,48)	6 (31,58)		28 (54,9)	17 (60,71)	
	GG	3 (7,89)	2 (10,53)		5 (9,8)	3 (10,71)	
CD14 rs2569190	AA	10 (26,32)	4 (21,05)	0,16	10 (19,61)	6 (21,43)	0,97
	AG	21 (55,26)	7 (36,84)		29 (56,86)	16 (57,14)	
	GG	7 (18,42)	8 (42,11)		12 (23,53)	6 (21,43)	
FGF3 rs1893047	AA	9 (23,68)	5 (26,32)	0,82	9 (17,65)	6 (21,43)	0,73
	AG	18 (47,37)	10 (52,63)		25 (49,02)	15 (53,57)	
	GG	11 (28,95)	4 (21,05)		17 (33,33)	7 (25)	
FGF10 rs900379	CC	9 (23,70)	2 (10,50)	0,47	4 (7,84)	4 (14,29)	0,67
	CT	14 (36,80)	9 (47,40)		22 (43,14)	11 (39,29)	
	TT	15 (39,50)	8 (42,10)		25 (49,02)	13 (46,43)	
LTF rs1126477	AA	5 (13,16)	0 (0)	0,23	3 (5,88)	0 (0)	0,10
	AG	12 (31,58)	8 (42,11)		12 (23,53)	11 (40,74)	
	GG	21 (55,26)	11 (57,89)		36 (70,59)	16 (59,26)	
OPG rs2073617	CC	5 (13,16)	4 (21,05)	0,17	9 (17,65)	9 (32,14)	0,31
	CT	22 (57,89)	6 (31,58)		24 (47,06)	12 (42,86)	
	TT	11 (28,95)	9 (47,37)		18 (35,29)	7 (25)	
RANKL rs9533156	CC	2 (5,27)	5 (26,32)	0,06	8 (15,69)	7 (25)	0,10
	CT	22 (57,89)	7 (36,84)		22 (43,14)	16 (57,14)	
	TT	14 (36,84)	7 (36,84)		21 (41,18)	5 (17,86)	

9.5. Aldagai zitologikoen arteko korrelazio-analisia.

Azterketa taldea		Detritusa	$\rho$	Mikrobiota sinplea	$\rho$	Hantura-zelulak: PMNak	$\rho$	Hantura -zelulak: Linfozitoak	$\rho$
KOT	Detritusa	1							
	Mikrobiota sinplea	0,29	<b>&lt;0,01</b>	1					
	Hantura zelulak: PMNak	0,43	<b>&lt;0,01</b>	0,32	<b>&lt;0,01</b>	1			
	Hantura zelulak: Linfozitoak	0,39	<b>&lt;0,01</b>	0,44	<b>&lt;0,01</b>	0,63	<b>&lt;0,01</b>	1	
	Hematiak	0,05	0,66	0,12	0,29	0,05	0,70	0,02	0,86
	Kolonizatutako zelula epitelialak	0,35	<b>&lt;0,01</b>	0,49	<b>&lt;0,01</b>	0,40	<b>&lt;0,01</b>	0,49	<b>&lt;0,01</b>
Pirik gabeko KAT	Detritusa	1							
	Mikrobiota sinplea	0,32	<b>0,01</b>	1					
	Hantura zelulak: PMNak	0,25	0,06	0,50	<b>&lt;0,01</b>	1			
	Hantura zelulak: Linfozitoak	0,17	0,20	0,27	<b>0,04</b>	0,38	<b>&lt;0,01</b>	1	
	Hematiak	0,08	0,55	0,14	0,30	0,36	<b>&lt;0,01</b>	0,02	0,90
	Kolonizatutako zelula epitelialak	0,33	<b>&lt;0,01</b>	0,38	<b>&lt;0,01</b>	0,34	<b>&lt;0,01</b>	0,27	<b>0,04</b>
PIdun KAT	Detritusa	1							
	Mikrobiota sinplea	0,43	<b>&lt;0,01</b>	1					
	Hantura-zelulak: PMNak	0,32	<b>&lt;0,01</b>	0,16	0,17	1			
	Hantura zelulak: Linfozitoak	0,31	<b>&lt;0,01</b>	0,22	<b>0,05</b>	0,47	<b>&lt;0,01</b>	1	
	Hematiak	0,04	0,75	0,10	0,39	0,35	<b>&lt;0,01</b>	0,01	0,90
	Kolonizatutako zelula epitelialak	0,69	<b>&lt;0,01</b>	0,50	<b>&lt;0,01</b>	0,40	<b>&lt;0,01</b>	0,41	<b>&lt;0,01</b>



