



ELSEVIER  
DOYMA

## Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral

www.elsevier.es/piro



### TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

## Prevalencia de los genotipos *fimA II* y *fimA IV* de *Porphyromonas gingivalis* en un grupo de mujeres mexicanas con diabetes gestacional en la región centro de México

Roberto Arturo García-Reyna<sup>a</sup>, María del Carmen Terrones Saldivar<sup>b</sup>, Angélica María Malacara-Rosas<sup>c</sup>, Nicolás Zaragoza-Velásquez<sup>a</sup>, Alejandro Rosas-Cabral<sup>b</sup> y Rafael Gutiérrez Campos<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Estomatología, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México

<sup>b</sup> Departamento de Medicina, Centro de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México

<sup>c</sup> Departamento de Química, Centro de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma de Aguascalientes, México

Recibido el 2 de octubre de 2013 y aceptado el 27 de marzo de 2014

#### PALABRAS CLAVE

*Porphyromonas gingivalis*;  
*fimA II*;  
*fimA IV*;  
Diabetes gestacional

#### Resumen

La diabetes gestacional (DG) es una de las complicaciones médicas que más frecuentemente afectan a las mujeres embarazadas; algunos autores reportan una prevalencia entre el 9,7 y el 13,9%. La DG puede ser causa de efectos adversos como: nacimiento pretérmino, macrosomía, nacimiento por cesárea, hiperbilirrubinemia, hipertensión gestacional, así como la predisposición de desarrollar posteriormente diabetes mellitus tipo 2 y síndrome metabólico. La literatura señala la asociación entre los microorganismos presentes en el biofilm subgingival, etiológicos de la inflamación de los tejidos de soporte dentarios y diabetes mellitus. Uno de estos microorganismos, *Porphyromonas gingivalis*, expresa, entre otros factores de virulencia, una proteína llamada fimbriolina, la cual presenta variaciones genotípicas relacionadas con su capacidad de inducción en la expresión de mediadores inflamatorios; los genotipos *fimA II* y *fimA IV* se consideran con mayor capacidad de virulencia y su presencia se ha asociado con la resistencia a la insulina. En este estudio analizamos la prevalencia de los genotipos *fimA II* y *fimA IV* en un grupo de mujeres mexicanas de la región central de México con DG, en mujeres con embarazo sin diabetes y mujeres sin embarazo y sin diabetes. Los resultados encontrados muestran una elevada presencia del genotipo *fimA II* en mujeres con DG ( $p < 0,05$ ).

© 2013 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\*Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gtzrafael@hotmail.com (R. Gutiérrez Campos).

**KEYWORDS**

*Porphyromonas gingivalis*;  
*fimA II*;  
*fimA IV*;  
 Gestational diabetes

## Prevalence of *fimA II* and *fimA IV* *Porphyromonas gingivalis* genotypes in a group of Mexican women with gestational diabetes in the central region of México

**Abstract**

Gestational diabetes (GD) is one of the most common complications in pregnant women, with some authors reporting prevalence between 9.7% and 13.9%. GD can lead to the following adverse effects: preterm birth, macrosomia, cesarean birth, hyperbilirubinemia, gestational hypertension, and predisposition to later develop diabetes mellitus type 2 and metabolic syndrome.

The literature shows an association between microorganisms in the subgingival biofilm, which produces inflammation of the dental support tissue, and diabetes mellitus. *Porphyromonas gingivalis* is one of these microorganisms, and among other virulence factors, it expresses a protein called fimbriin which has genotypic variations related to its ability to induce expression of inflammatory mediators. Genotypes *fimA II* and *fimA IV* are considered to have a greater virulence and their presence has been associated with insulin resistance.

An analysis is made on the prevalence of genotypes *fimA II* and *fimA IV* in a group of women in central region of Mexico with GD, pregnant women without diabetes, and non-pregnant women without diabetes. The results show an elevated presence of genotype *fimA II* in women with GD ( $P < .05$ ).

© 2014 Sociedad de Periodoncia de Chile, Sociedad de Implantología Oral de Chile y Sociedad de Prótesis y Rehabilitación Oral de Chile. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Antecedentes**

La diabetes gestacional (DG) es una de las complicaciones más comunes durante el embarazo. Se caracteriza por una alteración en el grado de intolerancia a los carbohidratos, con diversos grados de severidad, y puede o no resolverse después del parto<sup>1</sup>. Se estima que en el ámbito mundial, la DG afecta entre el 2 y 14% de la población dependiendo del grupo étnico en estudio<sup>2</sup>. La DG es causa de efectos adversos tanto en la madre como en el neonato tales como la hipertensión gestacional, el nacimiento pretérmino, macrosomia e hiperbilirrubinemia del neonato, así como la predisposición de desarrollar posteriormente diabetes mellitus (DM) tipo 2 y síndrome metabólico<sup>3,4</sup>. En México, el Instituto Nacional de Perinatología ha reportado entre el 9,7 y 13,9% de prevalencia de DG según estadísticas de 2005<sup>5</sup>.

Estudios recientes han demostrado una elevada prevalencia y asociación entre la DG y la inflamación de los tejidos de soporte de los dientes, atribuida esta a la presencia de flora patógena que se encuentra en el biofilm subgingival<sup>6,7</sup>.

Se ha sugerido que dichos microorganismos expresan factores de virulencia, los cuales estimulan las vías que conllevan inflamación sistémica y, por lo tanto, una reducción en la función y/o apoptosis de las células beta pancreáticas produciendo, finalmente, resistencia a la insulina tal y como sucede en la DM tipo 2<sup>8,9</sup>.

Uno de los microorganismos del biofilm subgingival con mayor patogenicidad es la *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)<sup>7</sup>, una bacteria asacarolítica y anaerobia que produce una amplia gama de factores de virulencia entre los que se incluyen cisteín-proteasas, lipopolisacáridos, cápsulas y fimbrias, estas últimas codificadas por el gen *fimA*. Todos esos factores están encaminados a la obtención de hierro y péptidos de crecimiento como fuente de energía a partir de la hemina (hierroprotoporfirina IX), la cual la obtiene de la hemoglobina, haptoglobina, mioglobina, hemopexina, metahe-

moglobina, oxihemoglobina, lactoperoxidasaalbúmina, catalasa, y citocromo c, de los glóbulos rojos mediante su reclutamiento en el lugar de la invasión<sup>10,11</sup>.

Su éxito como colonizador se debe a su capacidad de adhesión a los diferentes tipos de células de los tejidos de la cavidad oral, con otras bacterias, con la matriz extracelular y con componentes salivales. Esta capacidad de adhesión es proporcionada por las fimbrias, componente que además ha sido asociado a su potencial patogénico; de hecho, la mayoría de pacientes con inflamación de los tejidos de soporte dentarios (periodontitis) presentan el genotipo *fimA II* seguido en frecuencia por el genotipo *fimA IV*, mientras que el genotipo *fimA* tipo I, III y V se detectan mayoritariamente en los adultos sanos con presencia de *P. gingivalis*<sup>11</sup>.

En este trabajo se realizó un análisis de la prevalencia de la *P. gingivalis* de los genotipos *fimA II* y *IV* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en mujeres con DG, pacientes gestantes sin diabetes y pacientes sin embarazo y sin diabetes (SESD).

**Metodología****Población de estudio**

El presente trabajo es un estudio transversal, observacional, descriptivo. Las muestras fueron obtenidas del Hospital de la Mujer ISSEA de la ciudad de Aguascalientes, México, el cual atiende a mujeres del estado y ciudades circunvecinas de los estados de Jalisco y Zacatecas.

La prevalencia de los genotipos *fimA II* y *IV* de *P. gingivalis* fue analizada en 120 pacientes divididas en 3 grupos: el primer grupo correspondió a 40 mujeres embarazadas con diagnóstico de DG según los criterios de Carpenter, señalado en la guías de práctica clínica<sup>12</sup> que acudieron a cita de control al Servicio de Embarazo de Alto Riesgo. En el mo-

mento de la toma de la muestra todas las pacientes presentaron una hemoglobina glicosilada (HbA1c)  $\leq 6,5\%$ . El segundo grupo se conformó con 40 mujeres ESD. El tercer grupo correspondió a 40 mujeres SED que acudieron a cita de revisión ginecológica de rutina. Las características de los grupos fueron similares en cuanto a antecedentes educativos, edad, ingreso familiar, antecedentes familiares para diabetes, así como número de embarazos; ninguna participante recibió atención periodontal previa al embarazo.

A las pacientes de los 3 grupos se les realizó el Índice de Necesidad de Tratamiento Periodontal de la Comunidad (INTPC), según el manual de la Organización Mundial de la Salud<sup>13</sup>, el cual consiste en registrar un promedio por grupo de necesidad de atención periodontal considerando parámetros tales como sangrado al sondeo, profundidad de sondeo y presencia de sarro. A los parámetros referidos se les asigna uno de las siguientes categorías: código 0: sin sangrado al sondeo ni cálculo dental; la profundidad es  $< 3,5$  mm, no se requiere tratamiento; código 1: sangrado gingival al sondeo sin presencia de cálculo dental, la profundidad es  $< 3,5$  mm y solo se necesita mejorar la higiene; código 2: presencia de sangrado y cálculo dental, la profundidad es  $< 3,5$  mm y se necesita mejorar la higiene y detartraje; código 3: presenta los mismos signos que el anterior y una profundidad de 3,5 a 5,5 mm. Se requiere mejorar la higiene y raspado y alisado radicular, y código 4: lo mismo que el código anterior y una profundidad de 5,5 mm o más. Se requiere, además de raspado y alisado radicular, tratamiento quirúrgico. Finalmente, para la toma de la muestra, se consideró la cara mesial del 16; en caso de estar ausente, la cara mesial del 17. Este criterio se utilizó por ser además uno de los órganos dentales que erupciona a temprana edad (6 años), y, por ende, por tener una mayor probabilidad de encontrar alteraciones de los tejidos de soporte. Todas las pacientes fueron informadas acerca del procedimiento de la toma de muestra y el objetivo del estudio a fin de obtener su consentimiento informado.

### Obtención de las muestras

Se realizó aislado relativo y se secó con torunda de algodón la cara palatina del primer molar superior derecho o 16, y cuando este estaba ausente, en el 17. Las muestras se obtuvieron insertando una tira de papel FTA (Whatmann, Alemania; Buckinghamshire, Reino Unido) en 3 puntos. Las tiras tenían una medida de 1,5 mm de ancho por 12 mm de largo. Las tirillas de FTA se dejaron por espacio de 20 s, y posteriormente se depositaron en un microtubo donde fueron almacenadas a 4 °C hasta su uso. Todas las muestras fueron tomadas por duplicado. El procedimiento nos permitió tanto medir la profundidad del surco gingival como analizar la presencia de los genotipos de *P. gingivalis* a través de PCR. Todos los procedimientos fueron realizados por 2 operadores.

### Purificación de ácido ribonucleico

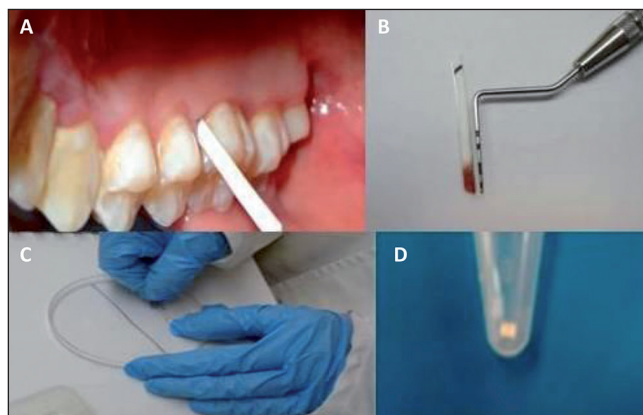
Los fragmentos de 1 mm del papel FTA fueron lavados y enjuagados de acuerdo con las especificaciones del proveedor (Whatmann, Alemania, Buckinghamshire, Reino Unido). Un fragmento de papel de 1 mm<sup>2</sup> fue utilizado para cada reacción de PCR, analizando así toda la zona correspondiente a la bolsa periodontal.

### Determinación de genotipos de *Porphyromonas gingivalis* por reacción en cadena de la polimerasa

La genotipificación de los genotipos II y IV de *P. gingivalis* fue llevada a cabo de acuerdo con los protocolos de Amano et al. (1999) con mínimas variaciones descritas más adelante. Los cebadores utilizados fueron: para *fimA II* F-5' ACA ACT ATA CTP ATG ACA ATG G 3' y R-5' y F-5' ACC AAC ACT CTC CTT GAC ATT G 3' y R-5' TAT TGG GAA GTG ACG ATC AGA G 3'. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen de 12,5  $\mu$ l, conteniendo 1,25  $\mu$ l de *buffer* 10X (Invitrogen, Sao paulo, Brasil), 1,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTP's, 0,8  $\mu$ M de cada primer, 2,5 U de *Taq* polimerasa recombinante (Invitrogen, Sao Paulo, Brasil). Para cada reacción, se utilizó como ADN molde un fragmento de 1 mm<sup>2</sup> de papel FTA. La amplificación se llevó a cabo por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, un alineamiento a 60 °C por 30 s, y la extensión a 72 °C por 60 s. Fueron necesarias una pre-desnaturalización a 94 °C por 10 min y una extensión final a 72 °C por 7 min. La determinación de los genotipos se llevó a cabo de forma separada o a través de PCR multiplex para detectar los genotipos simultáneamente. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, Estados Unidos). En el caso de las reacciones llevadas a cabo por separado, los productos fueron visualizados a través de electroforesis al 3% teñidos con EtBr. Asimismo, cuando se realizó la PCR multiplex, los productos fueron separados en un gel de acrilamida al 4% y teñidos con nitrato de plata. La razón de esto último es que los productos amplificados tienen un peso molecular de 257 pb para *fimA II* y 251 pb para *fimA IV*, lo cual dificulta observar la diferencia en la migración de ambos fragmentos en agarosa. Para todas las reacciones, se llevó a cabo una PCR, utilizando como control de reacción interna un fragmento de la b-globina usando los cebadores 5'-GGTTGGC-CAATCTACTCCCAGG-3' y 5-GCTCACTCAGTGTGGCAAAG-3' con las siguientes condiciones: la mezcla de amplificación consistió en 50 mmol de KC1, 10 mmol/l de Tris-HCl (pH 8,3), 0,1 g/l de gelatina, 1,5 mmol/l de MgCl<sub>2</sub>, 100-200 ng de ADN genómico, 0,7 mmol/l de cada cebador (E91s y E136as), 200 mMol/l para cada trifosfato de desoxinucleótido y 1,25 U de *Taq* polimerasa (Invitrogen St. MO., Estados Unidos) en un volumen final de 50  $\mu$ l. El programa de amplificación por PCR se realizó en un termociclador modelo 480 (Perkin-Elmer, Gouda, Holanda). Después de la desnaturalización a 94 °C durante 100 s, se llevaron a cabo 30 ciclos: desnaturalización a 94 °C durante 1 min, hibridación a 57 °C durante 1 min, y luego la extensión a 72 °C durante 2 min; la extensión final fue a 72 °C durante otros 10 min.

### Análisis estadístico

La prevalencia de *fimA II* y *fimA IV* se calculó dividiendo el número de pacientes que lo presentaron (x) entre el número de integrantes de cada grupo (n). En cada grupo, se analizó mediante una prueba de  $\chi^2$  para considerar la significancia estadística con un nivel de  $p < 0,05$ . Una vez establecida una diferencia estadísticamente significativa, se compararon las diferencias de prevalencia de los genotipos *fimA II* y *fimA IV* entre los grupos mediante una prueba de diferencia de proporciones con un intervalo de confianza de 95%. Para las dife-



**Figura 1.** Colecta y procesamiento de muestras del surco gingival utilizando tirillas de papel FTA. Las muestras fueron obtenidas insertando el fragmento de papel FTA en la cara del mesial del 16; los fragmentos fueron cortados en fragmentos de un 1 mm y utilizados posteriormente en la PCR para la determinación de genotipos de *P. gingivalis*.

rencias de medias de índice de masa corporal (IMC), ingreso y edad, se empleó una prueba ANOVA, considerando una diferencia significativa de  $p < 0,05$ . Una vez establecida la diferencia, se compararon las variables mencionadas utilizando una prueba de t de Student para establecer una diferencia significativa entre las medias de los grupos. Se analizaron las proporciones de profundidad y antecedentes heredo-familiares (AHF) mediante una prueba de  $\chi^2$ , considerando significancia con un nivel de  $p < 0,05$ . Todos los cálculos se realizaron en Minitabv15 para el análisis de las pruebas.

## Resultados

En un estudio transversal realizado en el Hospital de la Mujer ISSEA del estado de Aguascalientes, México, se determinó la prevalencia de los genotipos *fimA II* y *fimA IV* de *P. gingivalis* en mujeres con DG, mujeres embarazadas sin DG y mujeres SESD. Sin diferencias significativas en cuanto a la edad, escolaridad, ingreso familiar, número de embarazos y AHF para diabetes entre los diferentes grupos bajo estudio ( $p = 0,05$ ) (tabla 1).

Para la detección molecular y la genotipificación de *P. gingivalis*, se optimizó un protocolo descrito por Amano et al. (1999). Se seleccionaron los genotipos *fimA II* y *fimA IV* por ser reportados en la literatura como más prevalentes y patogénicos<sup>14,15</sup>. Las muestras fueron tomadas a través de un novedoso método consistente en el uso de tirillas elaboradas con papel FTA. En cada fragmento de 1 mm<sup>2</sup> (indicando este el nivel de profundidad), se analizó la presencia de ambos genotipos (fig. 1). Una comparación en la medición de la profundidad utilizando sonda periodontal y tirillas de papel FTA no mostró una diferencia significativa entre ambos métodos (desviación estándar  $\pm 0,1$  mm, datos no mostrados). La representación gráfica de los productos amplificados se muestra en la figura 2.

Al determinar el INTPC, se encontró que los grupos con DG y DG se ubicaron en el código 3, y el grupo SESD en el código 2 (tabla 2).

En relación con la profundidad establecida en el grado 3 ( $> 3$  mm), encontramos para *fimA II*, que no existe diferencia significativa entre DG vs. embarazo sin diabetes (ESD) ( $p = 0,778$ ), pero ambos presentan mayor profundidad que el grupo SESD ( $p = 0,000$ ). Para *fimA IV*, el grupo DG presentó mayor proporción que el grupo ESD ( $p = 0,005$ ) y que el grupo SESD ( $p = 0,000$ ); sin diferencia significativa, el grupo ESD y el grupo SESD ( $p = 0,177$ ). Para la proporción de genotipos de *P. gingivalis* encontrados por grupo de estudio, el genotipo *fimA II* fue más prevalente en mujeres con DG que en los demás grupos al estar en el 52,5% de las pacientes; mientras que el genotipo *fimA IV* tuvo mayor prevalencia en las mujeres que no presentaron embarazo ni diabetes con un 50%. Se encontraron diferencias significativas de prevalencia entre los grupos ( $\chi^2$ ) tanto para *fimA II* ( $p = 0,024$ ) como para *fimA IV* ( $p = 0,000$ ) (tabla 3).

Asimismo, al comparar la prevalencia de *fimA II* mediante una prueba de comparación para 2 proporciones encontramos que para *fimA II*, el grupo DG fue mayor que el grupo ESD ( $p = 0,018$ ), y al grupo SESD ( $p = 0,004$ ), pero no se encontró diferencia significativa entre el grupo ESD y el grupo SESD ( $p = 0,616$ ). Para el genotipo *fimA IV*, encontramos que la prevalencia en el grupo DG fue menor que en el grupo ESD ( $p = 0,020$ ), y que en el grupo SESD ( $P = 0,000$ ). Asimismo, en el grupo ESD, la prevalencia fue menor que el grupo SESD ( $p = 0,017$ ) (tabla 3).

**Tabla 1** Características demográficas de los grupos en estudio

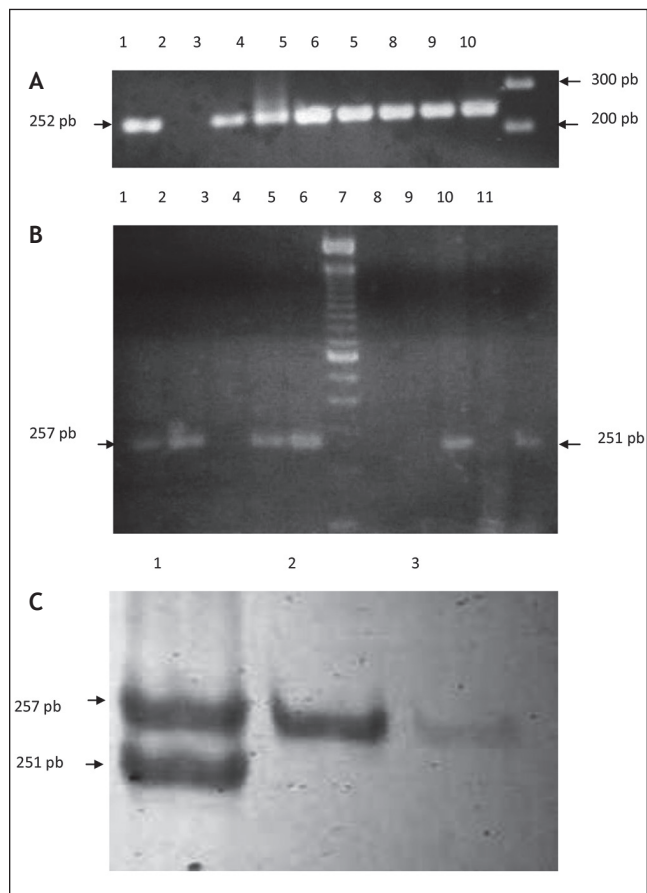
	Grupo DG	Grupo ESD	Grupo SESD	p
Edad	30,8 $\pm$ 5,26	28,8 $\pm$ 6,32	27,82 $\pm$ 8,32	0,087
<sup>1</sup> Escolaridad	7,0 $\pm$ 1,485	7,20 $\pm$ 1,604	7,15 $\pm$ 1,847	0,853
<sup>2</sup> Ingreso familiar	290 $\pm$ 129,38	325,38 $\pm$ 131	312,69 $\pm$ 174,56	0,479
Historia familiar para diabetes	30/40	22/40	20/40	0,054
Mediana de n.º de embarazos	3	2	2	0,147
<sup>3</sup> IMC	30,17 $\pm$ 5,13	24,85 $\pm$ 6,04	25,25 $\pm$ 5,19	0,000

<sup>1</sup>Expresado en años de estudio.

<sup>2</sup>Expresado en dólares.

<sup>3</sup>Expresado en kg/m<sup>2</sup>.

DG: diabetes gestacional; ESD: embarazo sin diabetes; IMC: índice de masa corporal; SESD: sin embarazo y sin diabetes.



**Figura 2.** Separación electroforética de productos de PCR para la caracterización de genotipos *fimA II* y *fimA IV* de *P. gingivalis*. Las muestras fueron amplificadas a partir de papel FTA introducido en el surco gingival de pacientes femeninas. Panel A: amplificación de fragmentos del gen de la b-globina como reacción de control interna. Carriles: 1) control positivo, ADN K 562, 2, control negativo (agua); carriles 3-9) muestras de pacientes; carril 10) marcador de peso molecular, 100 pb ladder. Panel B: caracterización de genotipos *fimA II* y *fimA IV* de *P. gingivalis* en geles de agarosa al 2%. Carriles: 1-5) muestras de pacientes amplificadas con cebadores para *fimA II*; carril 6) marcador de peso molecular, 100 pb ladder; carriles 7-11) muestras de pacientes amplificadas con cebadores para *fimA IV*. Panel C: amplificación a través de PCR multiplex utilizando cebadores contra *fimA II* y *fimA IV*. Los productos de amplificación fueron separados en geles de acrilamida al 3%. Carriles: 1) coinfección con *fimA II* y *IV*; 2-3) amplificación de genotipo *fimA II*.

De acuerdo con lo sugerido por la Federación Europea de Periodontología/Asociación Americana de Periodontología<sup>16,17</sup>, para estudios en donde se analicen asociaciones de alteraciones periodontales con DG, es necesario incluir otros factores como el sobrepeso (IMC), los AHF, la raza, la etnicidad y la localización geográfica, entre otros.

En este estudio se analizó la asociación de los AHF de DM tipo 2, el número de embarazos y el IMC con la prevalencia de los genotipos *fimA II* y *IV* de *P. gingivalis*. En las mujeres

positivas para *fimA II*: la proporción de antecedentes familiares para diabetes del grupo DG fue mayor que el grupo ESD ( $p = 0,044$ ), pero no se encontró diferencia con el grupo SESD ( $p = 0,169$ ); ni tampoco entre el grupo ESD y el grupo SESD ( $p = 0,420$ ). La media de edad del grupo DG fue mayor que la del grupo ESD ( $p = 0,048$ ) y mayor que el grupo SESD ( $p = 0,011$ ), pero no hubo diferencia entre el grupo ESD y el grupo SESD ( $p = 0,083$ ). No se encontró diferencia significativa en la mediana del número de embarazos entre los grupos ( $p = 0,180$ ). En el IMC, el grupo DG no fue diferente al grupo ESD ( $p = 0,158$ ), pero fue mayor que el grupo SESD ( $p = 0,010$ ); entre el grupo ESD y grupo SESD no presentó diferencia ( $p = 0,521$ ). En las mujeres positivas para *fimA IV*: el grupo DG presentó una mayor proporción de AHF que el grupo ESD ( $p = 0,006$ ), y que el grupo SESD ( $p = 0,001$ ), pero no se encontró diferencia entre el grupo ESD y el grupo SESD ( $p = 0,940$ ). La media del grupo de edad fue mayor en el grupo DG al compararla con el grupo ESD ( $p = 0,004$ ) y con el grupo SESD ( $p = 0,007$ ); el grupo ESD no fue diferente al grupo SESD ( $p = 0,116$ ). No se encontró diferencia estadística entre la mediana de embarazos entre los grupos ( $p = 0,084$ ). En el IMC no encontramos que entre el grupo DG y el grupo ESD existe diferencia ( $p = 0,569$ ) y tampoco entre el grupo DG y el grupo SESD ( $p = 0,596$ ); tampoco entre el grupo ESD y el grupo SESD ( $p = 0,900$ ) (tabla 4).

## Discusión

La asociación entre la periodontitis y la DG ha sido reportada por diversos autores. Es aceptado que la etiología de la periodontitis es debida a la presencia de múltiples microorganismos del biofilm subgingival<sup>18,19</sup>, pero la prevalencia y menos aún la importancia del proceso infeccioso en relación con la DG no es bien conocida.

En este estudio determinamos la prevalencia de *P. gingivalis*, uno de los agentes causales más relacionado con el inicio y progresión de la periodontitis y su relación con DG, en específico con los genotipos *fimA II* y *fimA IV*, que han sido relacionados con el grado de severidad de esta, según lo reportado por diferentes autores<sup>20-23</sup>.

**Tabla 2** Relación de la distribución del número de pacientes por grupo de acuerdo con la profundidad y grados de severidad y tratamiento señalado en el Índice de Necesidad de Tratamiento Periodontal de la Comunidad

Grupos de estudio	Grado 2 Menos de 3 mm n = 40 %		Grado 3 De 3 a 5,5 mm n = 40 %		Grado 4 Más de 5,5 mm n = 40 %	
Diabetes gestacional	8	20	31	77,5	1	2,5
Embarazadas sin diabetes	13	32,5	26	65	1	2,5
Sin embarazo y sin diabetes	34	85	6	15	0	0

La capacidad patogénica de estos genotipos es debida a su mayor capacidad de transcripción del gen *fimA*, a su habilidad de adherencia a las estructuras del hospedador y, por lo tanto de su colonización, además de su mayor capacidad de promover mediadores inflamatorios en comparación con los demás genotipos. Se ha demostrado que el genotipo *fimA II* tiene 20 veces mayor expresión del gen *fimA* que el genotipo *fimA IV*<sup>24</sup>. El genotipo II se ha asociado a la presencia de mayor profundidad de la bolsa periodontal, a mayor severidad de la lesión, en agrandamiento gingival por medicamentos y a una mayor presencia en DM tipo 2. En tanto que el genotipo *fimA IV* ha sido mayormente asociado a casos de gingivitis<sup>24,25</sup>. La alta presencia observada de este último genotipo en nuestro grupo control refleja el pobre impacto de los programas de salud en México.

A diferencia de la mayoría de los estudios relacionados, decidimos utilizar el INTPC, dado que el objetivo fundamental fue determinar si se encontraba presente *P. gingivalis* en mujeres con DG, más que su relación con el diagnóstico de periodontitis y si la proporción encontrada era diferente en mujeres con ESD y mujeres SESD.

Aunque se han realizado numerosos estudios para establecer la relación entre periodontitis y DG, los criterios diagnósticos empleados difieren, de tal suerte que unos consideran periodontitis a una profundidad al sondeo  $\geq 4$  mm y sangrado al sondeo, mientras que otros consideran una profundidad al sondeo  $\geq 4$  mm más o al sondeo y una

pérdida de inserción  $\geq 2$  mm más sangrado al sondeo<sup>26</sup>. Es importante señalar que el incremento en el volumen gingival durante el embarazo nos puede dar datos falsos para elaborar el diagnóstico. Por lo anterior, el empleo del INTPC nos permitió de una manera rápida conocer la condición de salud gingival de las pacientes. Estas aseveraciones toman mayor sentido cuando se toma en cuenta que el Hospital de la Mujer ISSEA de Aguascalientes atiende 13.500 embarazos al año (casi el 50% de los embarazos del estado), lo que genera un tiempo de consulta muy corto, y por otro lado, no se tiene contemplada la atención del estado de salud bucal, salvo casos de urgencia.

Una aportación del trabajo fue la de realizar la toma de la muestra utilizando tirillas de papel FTA, un sustrato ampliamente usado en la conservación de muestras forenses. El uso de papel FTA, por una parte, funciona de una manera muy similar a forma de sondaje, y por otra, permite conservar por mucho tiempo el ADN obtenido del biofilm subgingival; finalmente, permite, a través de PCR multiplex, la posibilidad de detectar simultáneamente múltiples patógenos del biofilm subgingival, entre ellos el complejo rojo; y en estudios longitudinales o de seguimiento, establecer la interrelación cronológica de los diferentes patógenos en la progresión de la enfermedad, tema ampliamente controversial en la literatura<sup>27</sup>. Asimismo, el uso de este sustrato permitió establecer el grado de profundidad al que se encontraron los genotipos de *P. gingivalis*. Detectando a los

**Tabla 3** Prevalencia y comparación de los genotipos *fimA II* y *fimA IV* entre los grupos estudiados

Grupos de estudio	<i>fimA II</i>				<i>fimA IV</i>			
	N	%	IC para diferencia de proporción	p	N	%	IC para diferencia de proporción	p
Diabetes gestacional	21	52,5	0,048-0,71	0,018	4	10	-0,03,-0,13	0,020
Embarazo sin diabetes	12	32,5	0,103-0,37	0,004	11	27,5	-0,24,-0,15	0,000
Sin embarazo sin diabetes	10	25	-0,14-0,24	0,616	20	50	-0,05,-0,174	0,017

IC: intervalo de confianza.

**Tabla 4** Relación de prevalencia de los genotipos *fimA II* y *fimA IV* con factores de riesgo para diabetes gestacional

	AHF diabetes		<sup>2</sup> Edad <sup>1</sup> $\mu \pm DE$	N.º embarazos Mediana	<sup>3</sup> IMC <sup>1</sup> $\mu \pm DE$
	n	%			
<i>fimA II</i>					
Diabetes gestacional	18/21	85,7	30,8 $\pm$ 6,63	3	29,4 $\pm$ 4,73
Embarazadas sin diabetes	07/13	53,8	28,8 $\pm$ 7,06	2	25,9 $\pm$ 7,38
Sin embarazo y sin diabetes	7/10	70	29,1 $\pm$ 7,89	3	24,1 $\pm$ 5,65
<i>fimA IV</i>					
Diabetes gestacional	4/4	100	29,2 $\pm$ 7,37	6	29,0 $\pm$ 5,72
Embarazadas sin diabetes	7/11	63,5	30,5 $\pm$ 6,67	3	26,9 $\pm$ 6,27
Sin embarazo y sin diabetes	13/20	65	29,85 $\pm$ 9,13	2	27,2 $\pm$ 5,67

<sup>1</sup>Media  $\pm$  desviación estándar.

<sup>2</sup>Expresada en años.

<sup>3</sup>Expresado en kg/m<sup>2</sup>.

AHF: antecedentes hereditarios; DE: desviación estándar; IMC: índice de masa corporal.

patógenos a una profundidad de hasta 2 mm, lo que nos permite establecer si una paciente está en riesgo potencial de desarrollar enfermedad periodontal en cualquiera de sus formas, aun sin manifestaciones clínicas, y administrar un tratamiento temprano. Es importante señalar que aunque, tal como se ha mencionado, no hubo diferencias significativas entre la medición de la profundidad del surco gingival a través de sonda periodontal y tirillas de papel FTA, este método no se propone como una forma de sustituir al uso de la sonda.

En este estudio encontramos una proporción > 50% del genotipo *fimA II* en las mujeres con DG, lo que nos permite establecer una estrecha asociación de este genotipo con la patología mencionada<sup>28</sup>. En un estudio realizado en México para conocer la prevalencia de los genotipos de *P. gingivalis* en pacientes con DM tipo 2 y con diagnóstico de periodontitis, se reportó que los genotipos *fimA I*, *fimA II* y *fimA IV* fueron los más prevalentes, lo que es congruente con los resultados de nuestro estudio. Asimismo, en dicha investigación se encontró que en pacientes sin diabetes ni periodontitis los genotipos encontrados fueron *fimA I* y *fimA II*<sup>29</sup>. Este hallazgo difiere de lo encontrado en nuestro estudio, ya que en nuestro grupo control, es decir, mujeres SESD, el 50% de ellas mostraron la presencia del genotipo *fimA IV*, y el 25%, de *fimA II*; sin embargo, son congruentes con lo reportado por Missailidis<sup>30</sup>, quien en un estudio realizado en una población brasileña con gingivitis, reportó una proporción de *fimA IV* del 65%. Cabe hacer mención de que al categorizar a las pacientes del grupo SESD de acuerdo con el INTPC se encontraban en grado 2. Es también probable que la discrepancia con el estudio realizado en México se deba a que de una muestra de 25 pacientes solo 17 eran mujeres.

La relación del genotipo *fimA II* con la DG se ve reforzada cuando se compara la prevalencia encontrada con el grupo de ESD y en donde se presenta una prevalencia del genotipo *fimA II* 50% menor que en el grupo de DG. Diversos autores han mencionado que la condición hormonal durante el embarazo favorece la colonización en los tejidos de soporte dental por *P. gingivalis*<sup>31</sup> ya que estas hormonas abastecen nutricionalmente a la bacteria. Queda de manifiesto al comparar estos 2 grupos que no solamente el estatus hormonal es suficiente para esta colonización<sup>32</sup>. Asimismo, se menciona que existen profundos cambios durante el embarazo que redundan en una inmunodepresión de la gestante lo que contribuiría a dicha colonización<sup>33</sup>. En la condición patológica de la DG, es evidente, en particular la endotelitis<sup>34</sup> y otros eventos adversos que generan una sobremigración de elementos humorales y celulares de la respuesta inmune pudieran contribuir al daño celular y permitir que la bacteria colonice esos sitios dañados<sup>35</sup>. Son necesarios más estudios para establecer los eventos bioquímicos que favorecen esta colonización del tejido de soporte en el caso de las mujeres con DG.

Con anterioridad, se ha reportado que la población de *P. gingivalis fimA II* es susceptible a los incrementos de la HbA1c<sup>36</sup>. En nuestro estudio, a pesar de que prácticamente todas las pacientes analizadas presentaban un buen control glucémico, determinado este con la glucosa basal y la HbA1c; encontramos una elevada prevalencia del genotipo *fimA II* de *P. gingivalis*. Esto no indica necesariamente que

esta se encuentre activa en cuanto a su infección, sin embargo, sugiere que este genotipo muestra una elevada persistencia, y que ante cambios fisiológicos específicos producto de la pérdida del control glucémico pueden generar una rápida producción de fimbrias y, por ende, una acelerada progresión de la enfermedad periodontal.

Los factores de riesgo para DG, de acuerdo con diversos estudios, como son: historia familiar de diabetes, obesidad (IMC) y multiparidad<sup>37,38</sup>, los consideramos en función de la presencia de los genotipos *fimA II* y *fimA IV*, encontrando que la edad y la proporción de familiares de primer grado con diabetes fue mayor en las mujeres *fimA II* positivas de las embarazadas con DG; pero no se encontró diferencia de IMC; esto sugiere que más que la obesidad y la edad, los antecedentes familiares para diabetes están asociados al genotipo *fimA II*.

En conclusión, en este estudio encontramos una estrecha asociación entre el genotipo *fimA II* de *P. gingivalis* y mujeres con DG con mínima necesidad de atención periodontal.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran no tener conflicto de intereses de ninguna índole.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a las mujeres participantes en el presente estudio. Asimismo, agradecen al Dr. José Armando Robles Ávila, director del Hospital de la Mujer del estado de Aguascalientes y a los Dres. Fernando Cahuantzi Jardón, Daniel Ely Bravo Aguirre y Leopoldo Serrano Díaz, subdirector, jefe de Enseñanza y jefe de la institución mencionada por permitirles recolectar las muestras para este estudio.

En particular, agradecen profundamente a la Universidad Autónoma de Aguascalientes por los recursos otorgados a través del proyecto PIBB-10N.

## Bibliografía

1. Karcaaltincaba D, Kandemir O, Yalvac S, Güvendag-Guven S, Haberal A. Prevalence of gestational diabetes mellitus and gestational impaired glucose tolerance in pregnant women evaluated by National Diabetes Data Group and Carpenter and Coustan criteria. *Int J Gynaecol Obstet.* 2009;106:246-9.
2. Dabelea D, Snell-Bergeon JK, Hartsfield CL, Bischoff KJ, Hamman RF, McDuffie RS; Kaiser Permanente of Colorado GDM Screening Program. Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus (GDM) over time and by birth cohort: Kaiser Permanente of Colorado GDM Screening Program. *Diabetes Care.* 2005;28:579-84.
3. American Diabetes Association. Gestational diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 2004;27 Suppl 1:S88-90.
4. Kautzky-Willer A, Bancher-Todesca D, Weitgasser R, Prikoszovich T, Steiner H, Shnawa N, et al. The impact of risk factors and more stringent diagnostic criteria of gestational diabetes on outcomes in central European women. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93:1689-95.
5. Delgado-Becerra A. Morbilidad del hijo de madre con diabetes gestacional, en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro

- Espinosa de los Reyes. *Perinatología y Reproducción Humana*. 2011;25:139-45.
6. Mesa F, Pozo E, Blanc V, Puertas A, Bravo M, O'Valle F. Are periodontal bacterial profiles and placental inflammatory infiltrate in pregnancy related to birth outcomes? *J Periodontol*. 2013;84:1327-36.
  7. Xiong X, Elkind-Hirsch KE, Vastardis S, Delarosa RL, Pridjian G, Buekens P. Periodontal disease is associated with gestational diabetes mellitus: a case-control study. *J Periodontol*. 2009;80:1742-9.
  8. Lowe LP, Metzger BE, Lowe WL Jr, Dyer AR, McDade TW, McIntyre HD; HAPO Study Cooperative Research Group. Inflammatory mediators and glucose in pregnancy: results from a subset of the Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome (HAPO) Study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:5427-34.
  9. Graves DT, Al-Mashat H, Liu R. Evidence that diabetes mellitus aggravates periodontal diseases and modifies the response to an oral pathogen in animal models. *Compend Contin Educ Dent*. 2004;25(7 Suppl 1):38-45.
  10. Nagano K, Abiko Y, Yoshida Y, Yoshimura F. Genetic and antigenic analyses of *Porphyromonas gingivalis fimA fimbriae*. *Mol Oral Microbiol*. 2013;28:392-403.
  11. Inaba H, Nakano K, Kato T, Nomura R, Kawai S, Kuboniwa M, et al. Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:29-35.
  12. Font-López KC, Cejudo-Carranza E, López-Caucana AE, Peralta-Pedrero ML, Díaz-Velásquez MF, Puello-Tamara E, et al. Guía de práctica clínica. Diagnóstico y tratamiento de la diabetes en el embarazo. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2010;48:673-84.
  13. Ainamo J, Barmes D, Beagrie G, Cutress T, Martin J, Sardo-Infirri J. Development of the World Health Organization (WHO) community periodontal index of treatment needs (CPITN). *Int Dent J*. 1982;32(3):281-91.
  14. Amano A, Nakagawa I, Okahashi N, Hamada N. Variations of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae in relation to microbial pathogenesis. *J Periodontol Res*. 2004;39:136-42.
  15. Van der Ploeg JR, Giertsen E, Lüdin B, Mörgeli C, Zinkernagel AS, Gmür R. Quantitative detection of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in dental plaque. *FEMS Microbiol Lett*. 2004;232:31-7.
  16. Chapple IL, Genco R; working group 2 of the joint EFP/AAP workshop. Diabetes and periodontal diseases: consensus report of the Joint EFP/AAP Workshop on Periodontitis and Systemic Diseases. *J Periodontol*. 2013;84(4 Suppl):S106-12.
  17. Borgnakke WS, Ylöstalo PV, Taylor GW, Genco RJ. Effect of periodontal disease on diabetes: systematic review of epidemiologic observational evidence. *J Periodontol*. 2013;84(4 Suppl):S135-52.
  18. Chokwiriyaichit A, Dasanayake AP, Suwannarong W, Hormdee D, Sumanonta G, Prasertchareonsuk W, et al. Periodontitis and gestational diabetes mellitus in non-smoking females. *J Periodontol*. 2013;84:857-62.
  19. Esteves Lima RP, Miranda Cota LO, Costa FO. Association between periodontitis and gestational diabetes mellitus: a case-control study. *J Periodontol*. 2013;84:1257-65.
  20. Dasanayake AP, Chhun N, Tanner AC, Craig RG, Lee MJ, Moore AF, et al. Periodontal pathogens and gestational diabetes mellitus. *J Dent Res*. 2008;87:328-33.
  21. Miura M, Hamachi T, Fujise O, Maeda K. The prevalence and pathogenic differences of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol Res*. 2005;40:147-52.
  22. Zhao L, Wu YF, Meng S, Yang H, OuYang YL, Zhou XD. Prevalence of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and periodontal health status in Chinese adults. *J Periodontol Res*. 2007;42:511-7.
  23. Zheng C, Wu J, Xie H. Differential expression and adherence of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes *Mol Oral Microbiol*. 2011;26:388-95.
  24. Nakano K, Inaba H, Nomura R, Nemoto H, Takeuchi H, Yoshioka H, et al. Distribution of *Porphyromonas gingivalis fimA* genotypes in cardiovascular specimens from Japanese patients. *Oral Microbiol Immunol*. 2008;23:170-2.
  25. Teixeira SR, Mattarazo F, Feres M, Figueiredo LC, De Faveri M, Simionato MR, et al. Quantification of *Porphyromonas gingivalis* and *fimA* genotypes in smoker chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2009;36:482-7.
  26. Armitage GC. Bi-directional relationship between pregnancy and periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2013;61:160-76.
  27. Vernon LT, Babineau DC, Demko CA, Lederman MM, Wang X, Toossi Z, et al. A prospective cohort study of periodontal disease measures and cardiovascular disease markers in HIV-infected adults. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2011;27:1157-66.
  28. Xiong X, Elkind-Hirsch KE, Vastardis S, Delarosa RL, Pridjian G, Buekens P. Periodontal disease is associated with gestational diabetes mellitus: a case-control study. *J Periodontol*. 2009;80:1742-9.
  29. Davila-Perez C, Amano A, Alpuche-Solís AG, Patiño-Marín N, Pontigo-Loyola AP, Hamada S, et al. Distribution of genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in type 2 diabetic patients with periodontitis in Mexico. *J Clin Periodontol*. 2007;34:25-30.
  30. Missailidis CG, Umeda JE, Ota-Tsuzuki C, Anzai D, Maye MP. Distribution of *fimA* genotypes of *Porphyromonas gingivalis* in subjects with various periodontal conditions. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19:224-9.
  31. Mariotti A. Sex steroid hormones and cell dynamics in the periodontium. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994;5:27-53.
  32. Mascarenhas P, Gapski R, Al-Shammari K, Wang HL. Influence of sex hormones on the periodontium. *J Clin Periodontol*. 2003;30:671-81.
  33. Soory M. Hormonal factors in periodontal disease. *Dent Update*. 2000;27:380-3.
  34. Ansaï T, Yamamoto E, Awano S, Yu W, Turner AJ, Takehara T. Effects of periodontopathic bacteria on the expression of endothelin-1 in gingival epithelial cells in adult periodontitis. *Clin Sci (Lond)*. 2002;103 Suppl 48:327S-31S.
  35. Hajishengallis G, Darveau RP, Curtis MA. The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10:717-25.
  36. Auyeung L, Wang PW, Liny RT, Hsieh CJ, Lee PY, Zhuang RY, et al. Evaluation of periodontal status and effectiveness of non-surgical treatment in patients with type 2 diabetes mellitus in Taiwan for a 1-year period. *J Periodontol*. 2012;83:621-8.
  37. Pirkola J, Pouta A, Bloigu A, Miettola S, Hartikainen AL, Järvelin MR, et al. Prepregnancy overweight and gestational diabetes as determinants of subsequent diabetes and hypertension after 20-year follow-up. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95:772-8.
  38. Clausen TD, Mathiesen ER, Hansen T, Pedersen O, Jensen DM, Lauenborg J, et al. Overweight and the metabolic syndrome in adult offspring of women with diet-treated gestational diabetes mellitus or type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2009;94:2464-70.