

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA



**COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE TOXINAS Y PROTECTINAS
EN *Escherichia coli* ASOCIADA A ENFERMEDAD PERIODONTAL**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE: LIC. EN BIOLOGÍA

PRESENTA:

DAVID ALÍ TOVAR GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. ERIC MONROY PÉREZ

Los Reyes Iztacala, Edo. Méx. Octubre 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

- **A la UNAM y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Por brindarme los recursos necesarios, para lograr una formación académica, ética y moral plena, siendo el sitio donde reformó mi pensar así como mi persona.**
- **Al Dr. Eric Monroy Pérez , mi tutor principal por todo el apoyo durante todo este proyecto , por tomarse el tiempo necesario para enseñarme el uso correcto del equipo de laboratorio así como las técnicas reflejando la pasión que tiene como profesionista. Muchas gracias por la paciencia y consejos.**
- **A la Dra. Gloria Luz Paniagua Contreras. Por confiar en mí y darme la oportunidad de estar en su laboratorio. Por instruirme correctamente en todo el proyecto.**

Agradecimientos personales

- **A mi Familia , por darme palabras de aliento y ser mi motivación principal en esta vida, sin su ayuda no habría podido llegar hasta donde estoy.**
- **A Diana Hernandez por acompañarme en toda la carrera, recordándome el motivo de hacer esto, por ser mi compañera de emociones y aventuras en este proceso, por estar a mi lado cuando más lo necesite y por su apoyo incondicional ante toda situación.**
- **A mis compañeros de laboratorio Ivan y Monse ya que fueron un apoyo enorme en el proceso del proyecto y les agradezco por no dejarme caer y que confiara en mí mismo.**

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
Enfermedad periodontal	5
Características de Escherichia coli	6
Patogenia	7
Factores de virulencia	7
Toxinas	8
Factor citotóxico necrotizante 1 (cnf1)	8
Alfa-hemolisina (HylA)	9
Proteína uropatógena específica (Usp)	9
Protectinas	9
Antígeno capsular (KPSMT)	10
ANTECEDENTES	12
JUSTIFICACIÓN	13
OBJETIVO GENERAL	13
MATERIAL Y MÉTODOS	14
Origen de las cepas	14
Resiembra de las cepas y extracción de DNA.	14
Identificación de E. coli por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	
Cultivo bacteriano para la extracción de RNAm	16
Extracción de RNA de las cepas de E. coli	16
Reversotranscripción	18
Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en Tiempo Real	18
RESULTADOS	20
Origen de las cepas analizadas	20
Identificación de E. coli por PCR	21
Frecuencia de genes de virulencia de E. coli relacionados a la enfermedad periodontal.	22
DISCUSIÓN	31
Origen de las cepas	31
Detección de los genes de virulencia	31
Expresión de los genes de virulencia	32
CONCLUSIONES	34
REFERENCIAS	35

RESUMEN

La enfermedad periodontal es ocasionada por diferentes bacterias anaerobias, sin embargo *Escherichia coli* ha sido identificada recientemente como colonizador secundario en la periodontitis. La patogenicidad de *E. coli* se debe a los numerosos genes de virulencia que posee. Se comparó la frecuencia de expresión de los genes que codifican para, toxinas y protectinas de *E. coli* periodontal utilizando dos diferentes caldos nutritivos de cultivo. Se analizaron cinco cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes con enfermedad periodontal de la clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala. La identificación de *E. coli* se realizó mediante la amplificación de la región 16S del gen rRNA por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en los caldos BHI (infusión cerebro corazón) y de soya tripticaseína (ST) a 37°C x 24 h en agitación constante. El RNA fue extraído de la pastilla celular bacteriana utilizando el equipo robotizado QIAcube alimentado con el Kit comercial RNeasy (QIAGEN). La síntesis de la cadena complementaria del DNA se realizó utilizando el Kit Reverse Transcription QuantiTect (QIAGEN). La determinación de la expresión de los genes de virulencia de *E. coli* fue realizada por PCR de Tiempo Real. El 100% (n=5) de las cepas crecidas tanto en BHI como en caldo de ST expresó los genes de toxinas; *usp* y *hlyA*, al igual que los genes que codifican protectinas *kpsMTII* y el gen *traT*. Los resultados evidenciaron que los porcentajes de expresión de los distintos marcadores de virulencia de *E. coli* fueron muy semejantes durante el cultivo en caldo BHI y de Soya Tripticaseína (ST). La expresión de los genes de toxinas y protectinas de *E. coli* podrían incrementar la agudeza de las infecciones periodontales

INTRODUCCIÓN

Enfermedad periodontal

Las enfermedades periodontales, también conocidas como enfermedades gingivales, son infecciones bacterianas graves que destruyen las encías y los tejidos que rodean la boca (Botero y Bedoya. 2010). Ocupa el segundo lugar entre las enfermedades bucales más padecidas por el hombre a partir de los 35 años. Por lo general, afecta a todos en algún momento de la vida y puede comenzar en la infancia. En la actualidad, la enfermedad periodontal se considera la principal enfermedad crónica que afecta a la dentición humana, afectando a una alta proporción de la población mundial (Bosshardt y Lang, 2005; Pihlstrom et al., 2005). Bajo condiciones normales, estas bacterias se adhieren continuamente a la superficie del diente, formando un biofilm bacteriano que contiene microorganismos específicos y complejas condiciones de interacción de cobertura (Bascones-Martínez y Figuero-Ruiz, 2004; Gomes *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2006). Como una verdadera comunidad, los microorganismos en la placa pueden reorganizarse y resistir los cambios ambientales. La enfermedad periodontal suele desarrollarse por cambios en esta microbiota, con aumento del número de bacterias y sustitución de especies inofensivas por especies patógenas, especialmente bacterias anaerobias Gram-negativas (Kolenbrander, 2000; Rosan y Lamont, 2000). Dentro del grupo de las enfermedades periodontales se encuentra la periodontitis crónica, patología infecciosa caracterizada por la formación de bolsas, que puede afectar un número variable de dientes. Además, ocasiona inflamación de los tejidos de soporte dental, pérdida ósea y de inserción (Armitage, 1999). Las lesiones pueden ser tan graves que pueden ocasionar pérdida de los dientes y alteración de la función masticatoria y estética, afectando por consiguiente el bienestar y calidad de vida de las personas (OMS, 1997).



Figura 1. Inflamación gingival con abundantes depósitos bacterianos. Tomado de Bascones Martínez *et al.*, 2005.



Figura 2. Periodontitis crónica. Tomado de Bascones Martínez *et al.*, 2005.



Figura 3. Periodontitis crónica con pérdida del ligamento alveolar y del diente. Tomado de Bascones Martínez *et al.*, 2005.

Características de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, y es considerado uno de los agentes causales más importantes de infecciones extraintestinales. Esta especie bacteriana puede ser agrupada en cepas comensales, patógenos intestinales y patógenos extraintestinales. En este último grupo se encuentran las cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC), las cepas productoras de

sepsis y de meningitis (Pitout 2012), además de las cepas de *E. coli* asociadas a enfermedad periodontal.

E. coli es un anaerobio facultativo no esporulado, generalmente móvil mediante flagelos peritricos, fermentador de glucosa y lactosa, reductor de nitratos a nitritos, catalasa positivo, oxidasa negativo, positivo en la prueba del indol y negativo para la hidrólisis de la urea. Se desarrolla en la mayoría de medios generales y selectivos para Gram-negativos como el Eosina Azul de Metileno (EMB) y el agar MacConkey.

La morfología colonial de estas bacterias en agar EMB (Eosina Azul de Metileno) se caracteriza por formar colonias de entre 2 a 3 mm de diámetro, con un centro grande oscuro y alrededor un color verde metálico.

Patogenia

Las cepas de *E. coli* se clasifican como patógenas intestinales y patógenas extraintestinales (Abe *et al.*, 2008). Las cepas de *E. coli* patógenas intestinales o también conocidas como *E. coli* diarreogénicas “DEC” se agrupan en 6 diferentes patotipos: *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* productora de la toxina Shiga (STEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de Adherencia difusa (DAEC). Por otro lado las patógenas extraintestinales se dividen en 3 tipos NMEC (*E. coli* causante de meningitis neonatal), SEPEC (causante de sepsis) y UPEC (*Escherichia coli* uropatógena) responsables de infecciones en el tracto urinario “UTI” (Toval, 2014).

La bacteria *E. coli* ha sido encontrada como un patógeno emergente secundario asociado a la enfermedad periodontal, tiene un papel significativo en la patogénesis de la periodontitis, participando en la formación de la bolsa periodontal, destrucción del tejido conectivo y reabsorción del hueso alveolar a través de mecanismos directos e indirectos (Page *et al.*, 2000).

Factores de virulencia

Las cepas de *E. coli* poseen numerosos factores de virulencia que le permiten a la bacteria colonizar el epitelio y persistir frente a la respuesta inmune del hospedero. Las cepas de *E. coli* extraintestinales presentan elevada diversidad genética debido a la presencia de genes de virulencia especializados y localizados en elementos genéticos móviles llamados islas de patogenicidad (Corbett y Roberts, 2008).

Las cepas de *E. coli* extraintestinales más estudiadas son las causantes de infecciones del tracto urinario (ITU), donde se ha estimado que entre un 70% a 95% de las ITUs son de origen comunitario (Pitout, 2012; Vimont *et al.*, 2012). Las cepas de *E. coli* asociadas a infecciones periodontales han sido muy poco estudiadas. Entre los factores de virulencia más importantes presentes en las cepas de *E. coli* extraintestinales se encuentran los genes relacionados con los sistemas de adquisición de hierro (*iroN*, *irp2* e *iuc*), las adhesinas (*fim*, *afaI*, *sfa*, *iha*, *tsh*, *papC* y *papGI, II* y *III*), protectinas (*kpsMT*, *ompT* e *iss*) y toxinas (*cnf1*, *hlyA*, *set*, *astA*, *vat*, *usp* y *cva/cvi*) (Figura 1; Tabla 1).

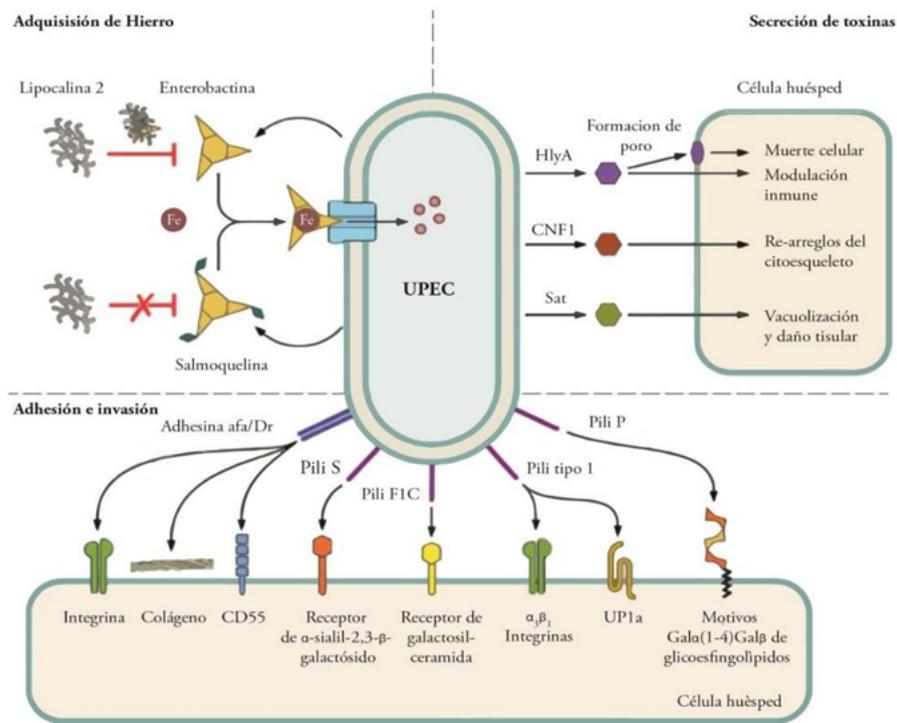


Figura 4. Factores de virulencia de UPEC y su interacción con el hospedero. Principales factores de virulencia relacionados a la adquisición de hierro, secreción de toxinas y adhesión e invasión. Tomado de Barber *et al.*, 2016.

Toxinas

Las toxinas de *E. coli* son importantes factores de virulencia que participan en el desarrollo de las infecciones. La producción de toxinas por parte de *E. coli* puede provocar una respuesta inflamatoria. Las toxinas ayudan al esparcimiento del patógeno en tejidos más profundos después de interrumpir la integridad celular; para tener acceso a nutrientes dentro de la célula del hospedero, o para destruir células efectoras del sistema inmune y así evadir su actividad antibacteriana (Lüthje y Brauner, 2014).

Factor citotóxico necrotizante 1 (cnf1)

El CNF1 conduce a una activación constitutiva de los miembros de la familia Rho, resultando en el rearrreglo del citoesqueleto de la célula huésped, provocando apoptosis de las células de la vejiga estimulando su exfoliación in vivo (Mills *et al.*, 2000) La activación de las Rho GTPasas afecta varias funciones celulares eucarióticas, incluyendo la formación de fibras de actina, lamelapodia, filopodia, la inducción del ondulamiento de membrana y la modulación de vías de señalización inflamatoria (Etienne-Manneville y Hall, 2002). El mecanismo de acción de estas toxinas, especialmente CNF1, se basa principalmente en la desaminación de la glutamina en la posición 63 de la proteína diana RhoA, formando ácido glutámico. Éste inhibe la hidrólisis intrínseca del GTP, estimulada por la GTPasa, activando la proteína (GAP). Por lo tanto, la desaminación de la glutamina 63, por el CNF1 permite la activación de la proteína Rho GTP e induce la reorganización de las fibras de estrés de la actina (Flatau *et al.*, 1997).

Alfa-hemolisina (HlyA)

La hemolisina α (HlyA) es una toxina dependiente de calcio de 110 kDa que forma poros de 2 nm de ancho en las células del hospedero, provocando lisis celular cuando se alcanzan altas concentraciones de ella (Wiles *et al.*, 2009). La síntesis, maduración y secreción de HlyA está determinada por el operón *hlyCABD* (Felmlee *et al.*, 1985; Issartel *et al.*, 1991; Koronakis *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 1996). Este polipéptido, denominado pro-HlyA, es la forma inactiva de la toxina, que se convierte en lítica luego de una activación postraduccional.

En cambio las concentraciones sublíticas de esta toxina pueden ser más relevantes fisiológicamente. De hecho, se ha demostrado que concentraciones sublíticas de un número de toxinas formadoras de poros pueden modular una gran variedad de rutas de señalización del hospedero, incluyendo estimulación pasajera de oscilaciones de calcio, la activación de la señalización MAPcinasa, y la alteración de los patrones de fosforilación y acetilación de las histonas (Hamon *et al.*, 2007; Ratner *et al.*, 2006). Adicionalmente, se ha encontrado que las concentraciones sublíticas de la hemolisina α potencialmente estimulan la inactivación de la serina/treonina cinasa Akt, que juega un papel central en la progresión del ciclo celular del hospedero, metabolismo, tráfico vesicular, sobrevivencia, y vías de señalización inflamatoria (Wiles *et al.*, 2008).

Proteína uropatógena específica (Usp)

La proteína uropatógena específica, codificada por el gen *usp*, está asociada a cepas aisladas de pielonefritis, prostatitis e infecciones en el tracto urinario (Yamamoto *et al.*, 2001; Rijavec *et al.*, 2008). La proteína uropatógena específica presenta actividad DNasa y, particularmente cuando se expresa a la par de Imu2, muestra actividad genotóxica en células de mamíferos (Nipic *et al.*, 2013). El daño al DNA provocado por genotoxinas lleva a la activación del mecanismo de respuesta a daño del DNA y al subsecuente arresto del ciclo celular. El daño irreversible en el DNA resulta en apoptosis o senescencia (Elmore, 2007).

Protectinas

Otro factor de virulencia clave asociado a *E. coli* extraintestinal es la cápsula de polisacárido, o antígeno K, en la superficie de la célula bacteriana (Corbett y Roberts, 2008).

La cápsula de *E. coli* es una estructura formada por polisacáridos repetidos de alto peso molecular firmemente unidos a la célula bacteriana y que envuelven su superficie. Tienen funciones protectoras frente a la desecación, la opsonización, la fagocitosis y frente a la acción bactericida del complemento. Junto con el antígeno O, el antígeno capsular o antígeno K (AgK) es el único polisacárido de superficie específico de serotipo.

Los 80 serotipos capsulares de *E. coli* se clasificaron originalmente con base en sus propiedades serológicas (Jann *et al.*, 1992), pero la incorporación de criterios bioquímicos y

genéticos reorganizó estas estructuras en cuatro grupos (Grupo 1-4), con características comunes en cuanto a ensamblaje entre los grupos 1 y 4, y 2 y 3 respectivamente.

Antígeno capsular (KPSMT)

Se sabe que la expresión del antígeno K es importante para los patógenos bacterianos invasivos, ya que les permite combatir las defensas innatas del hospedero como la fagocitosis (Weiss *et al.*, 1982). Existen 4 grupos de cápsulas, las cuales a su vez se clasifican en varios subtipos. Las cápsulas más frecuentes son las del grupo II, dentro de este la cápsula K2, que permite resistir a la muerte mediada por el sistema del complemento y la K5, que protege a la bacteria de la unión a los neutrófilos inhibiendo la fagocitosis (Buckles *et al.*, 2009; Subashchandrabose *et al.*, 2015). Existe un subtipo de cápsula que estaría implicado en la formación de comunidades bacterianas intracelulares (CBI) que es la K1, siendo responsable de la morfología de la CBI (Anderson *et al.*, 2010).

En la Tabla 1 se observan los principales factores de virulencia de UPEC.

Gen	Nombre
Protectinas	
<i>kpsMT II</i>	Group II capsule
<i>kpsMT III</i>	Group III capsule
<i>rfc</i>	Replication factor C
<i>traT</i>	Outer-membrane protein gene; serum resistance
Toxinas	
<i>cdtB</i>	Cytolethal distending toxin B
<i>cnf-1</i>	Cytotoxic necrotizing factor 1
<i>hlyA</i>	hemolysin A
Relacionados con la captación de Hierro	
<i>iutA</i>	Ferric aerobactin; iron transport
<i>feoB</i>	ferric iron uptake
<i>ireA</i>	Iron-responsive element
<i>fyuA</i>	Ferrichrome receptor FiuA
Adhesinas	

<i>afa</i>	Afimbrial adhesin I
<i>fimH</i>	Fimbriae
<i>gafD</i>	Fimbriae of diarrhea-associated
<i>papC</i>	Pyelonephritis-associated protein
<i>papA</i>	
<i>papG</i>	
<i>sfa</i>	S fimbrial adhesins
<i>focG</i>	F1C minor fimbrial subunit protein G

Tabla 1. Genes de virulencia en UPEC.

El análisis molecular de las cepas de *E. coli* como patógeno emergente secundario relacionado a la enfermedad periodontal y su participación en la patogénesis de la periodontitis no ha sido estudiado hasta el momento, por lo que en este estudio se determinará la expresión de los genes de virulencia que codifican para toxinas y protectinas en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal.

ANTECEDENTES

- Abe *et al.*, (2008) en Sao Paulo, Brasil realizaron un trabajo para estudiar en 225 cepas de *E. coli* uropatógenas la distribución de los distintos marcadores de virulencia. Las frecuencias de los genes de virulencia fueron: *fim* 93.8%, *irp2* 68.9%, *kps* 51.5%, *pap* 45.8%, *hly* 44%, *iha* 40.4%, *aer* 39.6%, *sfa* 29.8% y *cnf* 23.6%.
- Medina *et al.*, (2012) en Medellín, Colombia examinaron la presencia de microorganismos subgingivales de 76 pacientes con periodontitis crónica. Los microorganismos con mayor frecuencia fueron *P. gingivalis* (64,4%), *F. nucleatum* (46,3 %) y *P. intermedia/nigrescens* (44,3%), los cuales son microorganismos comunes relacionados con las enfermedades periodontales. Además, se observaron bacilos entéricos Gram-negativos en 20 (26.31%) de 76 pacientes.
- Momtaz *et al.*, (2013) en un estudio realizado en Irán, identificaron 26 genes de virulencia, serogrupos y resistencia a antibióticos en 123 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infecciones en el tracto urinario. El gen detectado con mayor frecuencia fue *fim* (86.1%) y *set1* (79.6%), mientras que *usp* y *kpsMT* presentaron menos frecuencia con el 1.6% y 4%, respectivamente. El serogrupo predominante fue el O25 (26%), y el 100% de las cepas fue resistente a la penicilina.
- Millán *et al.*, (2014) en Yucatán, México determinaron la distribución de los diferentes grupos filogenéticos y de los marcadores de virulencia en 28 cepas UPEC productoras de β -lactamasas, colectadas de pacientes con infecciones del tracto urinario. El grupo B2 se encontró con mayor frecuencia asociado con 4 combinaciones de genes (7/12); el gen *fyuA* fue el de mayor prevalencia con 67.8% (n=19), seguido de *fymH* 50% (n=14), *kpsMTII* 35.7% (n=10), *PAI* 21.4% (n=6), *ups* 25% (n=7) y *papA* 7.1% (n=2).
- Tarchouna *et al.*, (2013) en Susa, Túnez evaluaron el papel de los factores de virulencia de *E. coli* en la patogénesis de la infección del tracto urinario. Analizaron 90 cepas UPEC por PCR para detectar la prevalencia de siete genes: Fimbrias tipo 1 (*fimH*), pili asociada con pielonefritis (*pap*), flagelo (*f1C*), fimbrias (*sfa* y *foc*), adhesina (*afa*), citotoxina necrotizante (*cnf*), hemolisina (*hly*) y aerobactina (*aer*). La prevalencia para *fimH* fue del 68 %, del 41% para *pap* y del 34% para *sfa/foc*. Los operones que codifican para las adhesinas fimbriales *afa* se identificaron en el 20 % de las cepas. *hly* y los genes que codifican para las toxinas *cnf* se detectaron en el 19% y 3% de las cepas, respectivamente. La prevalencia para el gen *aer* fue del 52 %.

JUSTIFICACIÓN

Debido a que en nuestro país existe muy poca información a nivel molecular sobre *E. coli* periodontal, el objetivo de este trabajo será determinar la expresión de genes de toxinas y protectinas en cepas de *Escherichia coli* asociadas a enfermedad periodontal.

OBJETIVO GENERAL

Caracterización molecular de cepas de *E. coli* asociadas a enfermedad periodontal.

OBJETIVOS PARTICULARES

Identificación por PCR convencional de los genes de toxinas (*usp*, *hlyA* y *cfh1*) y protectinas (*traT* y *kpsMT 2*) en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal.

Determinar por PCR en Tiempo Real la expresión de los genes de toxinas y de protectinas en las cepas de *E. coli*, bajo crecimiento en dos diferentes caldos nutritivos de cultivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de las cepas

Las cepas de *Escherichia coli* (n=5) fueron aisladas previamente de pacientes con infecciones periodontales de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala.

Las cepas periodontales de *E. coli* y la cepa control (ATCC 25922) se encuentran almacenadas en medio BHI (infusión-cerebro-corazón) más Glicerol en el Laboratorio de Análisis Clínicos, CUSI, FES Iztacala, UNAM.

Resiembra de las cepas y extracción de DNA.

A partir del medio de cultivo de BHI más glicerol se tomó un inóculo por medio de un asa estéril de las cepas y del control por separado, se sembraron en 2 mL de BHI y se incubaron a 37° C por 24 horas. Al término se tomó un inóculo de las muestras por medio de un asa estéril y se sembraron por el método de estría cruzada en el agar Mueller Hinton (MH), y se incubó a 37° C por 24 horas. A partir del crecimiento bacteriano se tomaron varias colonias con un asa estéril y se depositaron en un tubo con tapón de rosca de 16x150 que contiene 2 mL de agua desionizada estéril. El inóculo se agitó en un vortex por 30 segundos y se llevó a ebullición durante 20 min. Al término la muestra se colocó en hielo por 10 min. y se centrifugó 14,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante que contiene el DNA se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se guardó a -20 °C hasta su utilización.

Identificación de *E. coli* por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

La identificación molecular de *E. coli* por PCR de punto final se realizó mediante la amplificación del gen 16S rRNA utilizando los oligonucleótidos wl-3110 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTGAGTT) (Lane *et al.*, 1985). El volumen final para la mezcla de reacción fue de 25 μ L; 12 μ L de Taq DNA polimerase 2x Master mix Red (AMPLIQON), 9 μ L de agua libre de nucleasas, 1 μ L de cada oligonucleótido (forward y reverse; 10 pmoL) y 2 μ L del DNA bacteriano (100 ng). Las condiciones para esta ronda de PCR consistió en una fase de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineamiento a 55°C por 1 minuto y una extensión a 72°C por 1 minuto. Para terminar, la fase de extensión se prolongó por 5 minutos a 72°C. En cada ensayo de PCR se utilizó como control positivo la cepa de *E. coli* ATCC 11775. El tamaño del amplicón esperado fue de 919 pb.

Detección de los genes de virulencia por PCR

Los genes de toxina; *usp* (specific uropathogenic protein), *hlyA* (haemolysin A), y *cnf1* (cytotoxic necrotising factor 1), y de las protectinas; *traT* (complement resistance protein.), *kpsMTII* (K-antigen), de *E. coli* fueron identificados por PCR de acuerdo a lo descrito con Momtaz (2013). Las condiciones de PCR, la secuencia de los oligonucleótidos y el tamaño de los amplicones se observan en la tabla 2.

GEN	TAMAÑO DEL AMPLICÓN	SECUENCIA DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS (5' -3')	CONDICIONES DE PCR
<i>usp</i>	1000	<p>F ACATTCACGGCAAG CCTCAG</p> <p>R AGCGAGTTCCTGGT GAAAGC</p>	Desnaturalización inicial de 12 min a 95 °C para activar el AmpliTaq Gold Taq, 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 63 °C y 3 min a 68 °C, con un ciclo final de 10 min a 72 °C, seguido de una retención a 4 °C.
<i>hlyA</i>	1177	<p>F AACAAAGGATAAGCA CTGTTCTGGCT</p> <p>R ACCATATAAGCGGT CATTCCCGTCA</p>	

<i>cnf1</i>	490	<p>F ATCTTATACTGGATG GGATCATCTTGG</p> <p>R GCAGAACGACGTTT TTCATAAGTATC</p>
<i>traT</i>	290	<p>F GGGATGAGCGGGC CTTTGAT</p> <p>R CGGGCCCCCAAGTA ACTCG</p>
<i>kpsMTII</i>	272	<p>F GCGCATTTGCTGAT ACTGTTG</p> <p>R CATCCAGACGATAA GCATGAGCA</p>

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos y condiciones de PCR empleadas para la detección de expresión de los marcadores de virulencia en las cepas.

Cultivo bacteriano para la extracción de RNAm

Para la extracción del RNAm de bacterias es fundamental promover la expresión de los genes en estudio *usp*, *hlyA*, *cnf-1*, *traT* y *KpsmT* de *E. coli*, para lo cual las bacterias de *E. coli* se crecieron en 3 mL de caldo BHI (infusión-cerebro-corazón), y caldo de soya tripticaseína (ST) a 37° C durante 24 h en agitación constante. Al término 2 mL de los cultivos fueron centrifugados a 3000 rpm durante 3 minutos, se decantó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida en 2 mL de buffer fosfato salino (PBS). Se realizaron diluciones 1:10 en caldo BHI y ST esteril hasta obtener una $DO_{600nm} = 0.4$, lo que indicó una concentración de 1×10^9 células. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 2000 rpm por tres minutos, al término la pastilla fue resuspendida en Buffer Fosfato Salino (PBS), posteriormente se agitaron en un vortex por 10 segundos y se centrifugaron (2000 rpm por tres minutos). Se decantó el sobrenadante y la pastilla se utilizó para la extracción del ARN.

Extracción de RNA de las cepas de *E. coli*

La extracción total de RNA se realizó con el kit comercial Mini Kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Germany) utilizando el equipo robotizado QIAcube (Figura 2). Para lo cual, las pastillas bacterianas obtenidas de la infección celular fueron colocadas en la placa de agitación del

equipo. Al mismo tiempo en la posición “A” de la sección correspondiente al buffer de lisis se colocó el buffer TE (solución preparada a pH de 8 con 10 Mm Tris-Cl, 1 Mm de EDTA y 1 mg/mL de lisozima). Después de alimentar el equipo QIAcube con los diferentes reactivos del kit RNeasy, se llenó el contenedor con puntas de 1 mL y se depositaron los tubos de columna y elución en el carrusel (centrífuga) del equipo. Finalmente el QIAcube se programó para la extracción de RNA con lisis celular siguiendo el protocolo del fabricante (RNeasy Protect Bacteria® Qiagen, Hilden, Germany) y se inició la corrida. El equipo robotizado añadió 100 μ L de buffer TE (Tris-EDTA) a cada tubo con la pastilla celular de bacteria cosechada después del cultivo en los agares. Los tubos fueron agitados para lisar las paredes celulares. Posteriormente el robot QIAcube adiciono volúmenes de los distintos buffers del kit comercial RNeasy y realizó repetidos pasos de centrifugación y agitación para los diferentes procedimientos: Agregó 350 μ L de buffer RLT (amortiguador de pH de lisis con Isotiocianato de guanidina con 100 μ L/mL de β -mercaptoetanol) que permitió inactivar las RNAsas y favorecer la unión del RNA a la membrana de sílica de la columna utilizada en el QIAcube.

Al término el equipo añadió 350 μ L de etanol al 95% para homogeneizar el lisado, se mezclaron suavemente los tubos y se trasladaron 700 μ L de la mezcla a la columna contenida en un tubo de 2 mL, se centrifugaron los tubos a 10.000 rpm durante 15 segundos y el líquido de flujo fue desechado. Después se adicionaron 700 μ L del buffer de lavado RW1 (Cloruro de guanidina y etanol) a la columna, para la eliminación de biomoléculas no deseadas y se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos, nuevamente el líquido de flujo fue desechado. Al terminar el robot añadió 500 μ L de buffer RPE (amortiguador de pH de lavado con 4 volúmenes de etanol al 96%) a la columna que permitió eliminar los rastros de sales, que todavía estarán en la columna debido a los buffers y el equipo centrifugó a 10,000 rpm durante 15 segundos para lavar la membrana, el líquido de flujo fue descartado. Nuevamente el robot adicionó 500 μ L de buffer RPE a la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 2 minutos para volver a lavar la membrana y remover restos de sales, descartando nuevamente el líquido de flujo.

Finalmente el robot movió y depósito la columna en un tubo colector nuevo de 2 mL, centrifugó durante 1 minuto y el equipo adicionó 30 μ L de agua libre de RNAsas directamente sobre la membrana de la columna y centrifugó a 10,000 rpm durante 1 minuto para obtener el RNA. La concentración total del RNA se midió utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Debido a la inestabilidad del RNA, se realizó inmediatamente la reversotranscripción a DNAc.

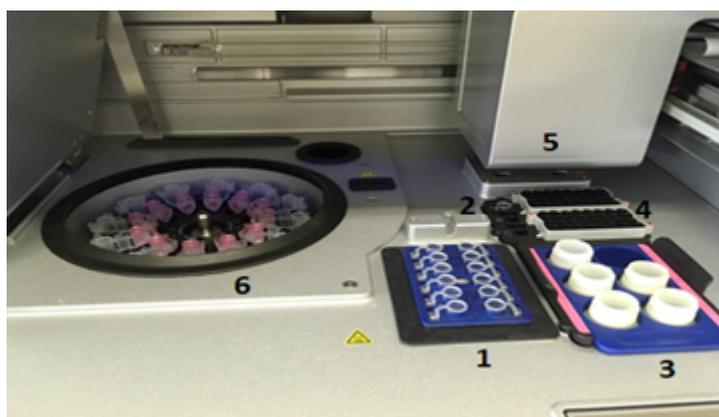


Figura 5. Interior del equipo QIAcube. 1. Placa de agitación, 2. Posición para buffer de lisis, 3. Posición para reactivos MiniKit RNeasy, 4. Contenedor de puntas, 5. Brazo robótico, 6. Carrusel (centrífuga).

Reversotranscripción

Para el proceso de la reversotranscripción de RNA a DNAc se utilizó el kit comercial QuantiTec Reverse transcription (Qiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Primero se realizó la eliminación de DNA genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 μL se agregaron cada uno de los siguientes componentes: Para cada muestra se depositaron en un tubo eppendorf; 2 μL de gDNA Wipeout buffer7x®, 7 μL de H_2O libre de RNAsas y 5 μL de RNA molde. Posteriormente se incubó a 42°C durante 2 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo. Para la reversotranscripción se preparó la mezcla de reacción en un tubo eppendorf con todos los componentes necesarios para la síntesis de la primera cadena de cDNA: 1 μL de Quantiscript Reverse Transcriptasa®, 4 μL Quantiscript RT buffer 5x®, 1 μL RT Primer mix® y 14 μL de RNA templado (obtenido de la reacción anterior) para un volumen final de reacción de 20 μL . Posteriormente los tubos se incubaron a 42°C por 15 minutos. Para inactivar la transcriptasa reversa el tubo se incubó en un termoblock a 95°C durante 3 minutos. La concentración total del DNAc se midió utilizando un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific). Finalmente el DNAc obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización para PCR en Tiempo Real.

Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en Tiempo Real

Los oligonucleótidos que se utilizaron para la expresión de *usp*, *hlyA*, *cnf-1*, *traT* y *KpsmT* fueron los mismos que se utilizaron para la identificación por PCR convencional. Para determinar la expresión de los diferentes genes de virulencia se utilizó el aparato de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor Gene). El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μL : 12.5 μL de la master mix SYBRGreen PCR (QIAgen), 1 μL del oligonucleótido Forward (10 pmol), 1 μL del oligonucleótido Reverse (10 pmol), 9.5 μL de agua libre de nucleasas y 1 μL de cDNA templado (500 ng/ μL). Las condiciones de amplificación fueron: un ciclo de activación de la Hot Start a 95°C durante 5 minutos y 40 ciclos de amplificación, que se inicia con la desnaturalización a 95°C por 5 segundos y finalmente alineación a 60 °C por 10 segundos. Los controles internos (House keeping) para cada ensayo fueron los genes *RPO*

(RNA polymerase sigma) y *ARCA* (Aerobic Respiration Control Protein). La melting point se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real. La cepa de *E coli* ATCC 11775 se usó como control positivo en cada ensayo.

RESULTADOS

Origen de las cepas analizadas

En este estudio se analizó un grupo de cepas de *E. coli* (n=5) previamente aisladas de pacientes de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala por presentar signos y síntomas de enfermedad periodontal. El 60% (n=3) de los pacientes correspondió a mujeres y el 40% (n=2) a hombres (Figura 6).

La distribución de los pacientes según el rango de edad fue la siguiente: el 60% (n=3) presentó una edad comprendida en el intervalo de 71 a 80 años y 40% (n=2) entre 61 a 70 años (Figura 7).



Figura 6. Distribución de los pacientes analizados por sexo.

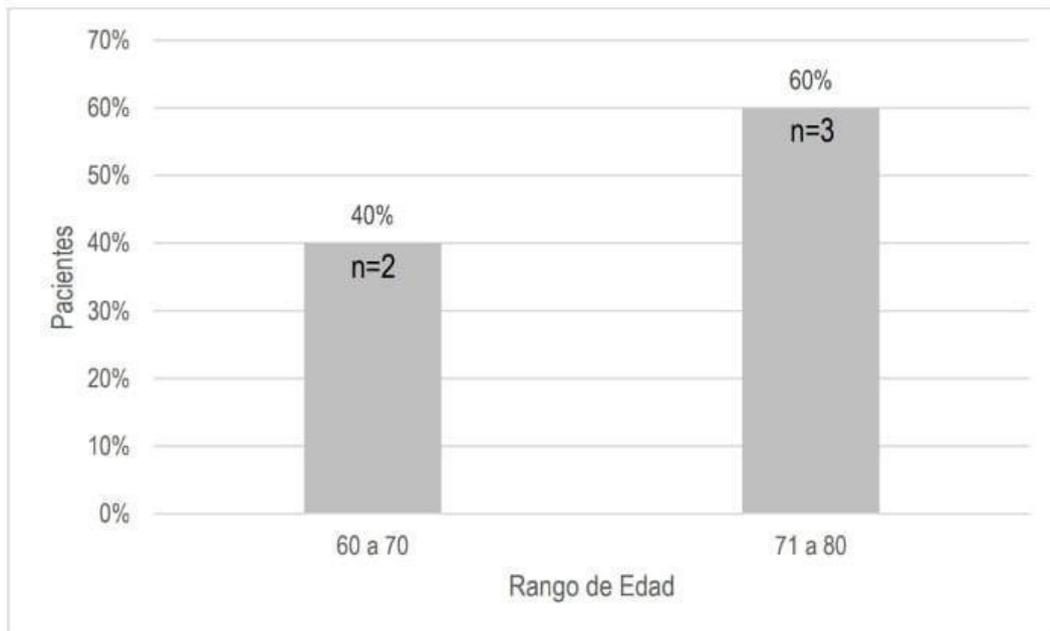


Figura 7. Distribución de los pacientes por edad.

Identificación de *E. coli* por PCR

Las cepas de *E. coli* fueron identificadas mediante amplificación por PCR del gen 16S rRNA (Figura 8).

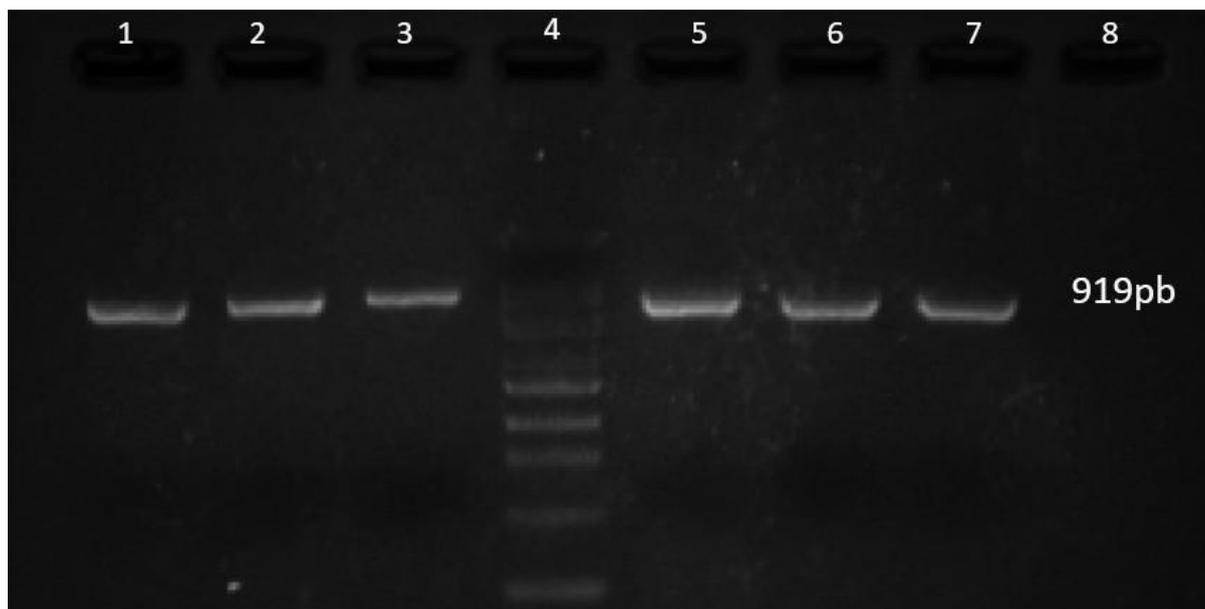


Figura 8. Detección por PCR de *E. coli* por amplificación del gen 16S rRNA (amplicón de 919 pb). Carriles 1-3, y 5-6 cepas de *E. coli* de pacientes; carril 4 marcador de peso molecular

(MWM;100 pb); carril 7 control positivo (*E. coli* ATCC 25922); carril 8 carril negativo (sin DNA molde).

Frecuencia de genes de virulencia de *E. coli* relacionados a la enfermedad periodontal.

El diagnóstico más frecuente en los pacientes analizados fue la enfermedad periodontal moderada con el 60% (n=3), seguido de enfermedad periodontal crónica con el 40% (n=2; Tabla 3). El gen *kpsMT 2* (figura 9) y *traT* (figura 10) fueron identificados en el 20% (n=1) de las cepas de pacientes con periodontitis moderada y crónica, en cada caso (Tabla 3), mientras que *cnfI* (figura 11) sólo se identificó en una cepa de un paciente con periodontitis moderada. Los genes de las toxinas *hlyA* (figura 12) y *usp* (figura 13) se identificaron en todas las cepas (100%), tanto de los pacientes con periodontitis moderada, como crónica.

Gen	Función	Periodontitis moderada (n=3) No. (%)	Periodontitis crónica (n=2) No. (%)	TOTAL (n=5) No. (%)
<i>kpsMT II</i>	<u>Protectinas</u>	1 (20)	1(20)	2 (40)
<i>traT</i>		1 (20)	1(20)	2 (40)
<i>cnfI</i>	<u>Toxinas</u>	1 (20)	0	1 (20%)
<i>hlyA</i>		3 (60)	2 (40)	5 (100%)
<i>usp</i>		3 (60)	2 (40)	5 (100%)

Tabla 3. Frecuencia de detección de los marcadores de virulencia de las cepas de *E.coli* periodontales.

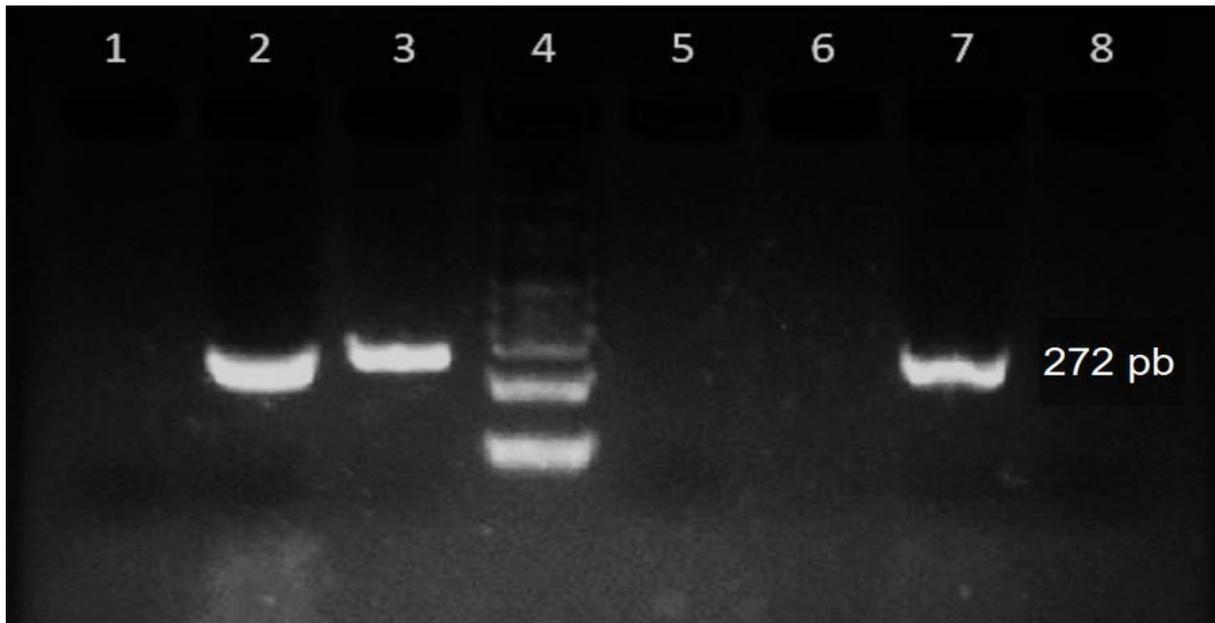


Figura 9. Detección del gen *KpsMT II* por PCR (amplicón de 272 pb). Carriles 2-3, *KpsMT II* en cepas de *E. coli* de pacientes; carril 4, marcador de peso molecular (MWM;100 pb); carril 7, control positivo (ATCC 25922); carril 8, control negativo (sin DNA molde).

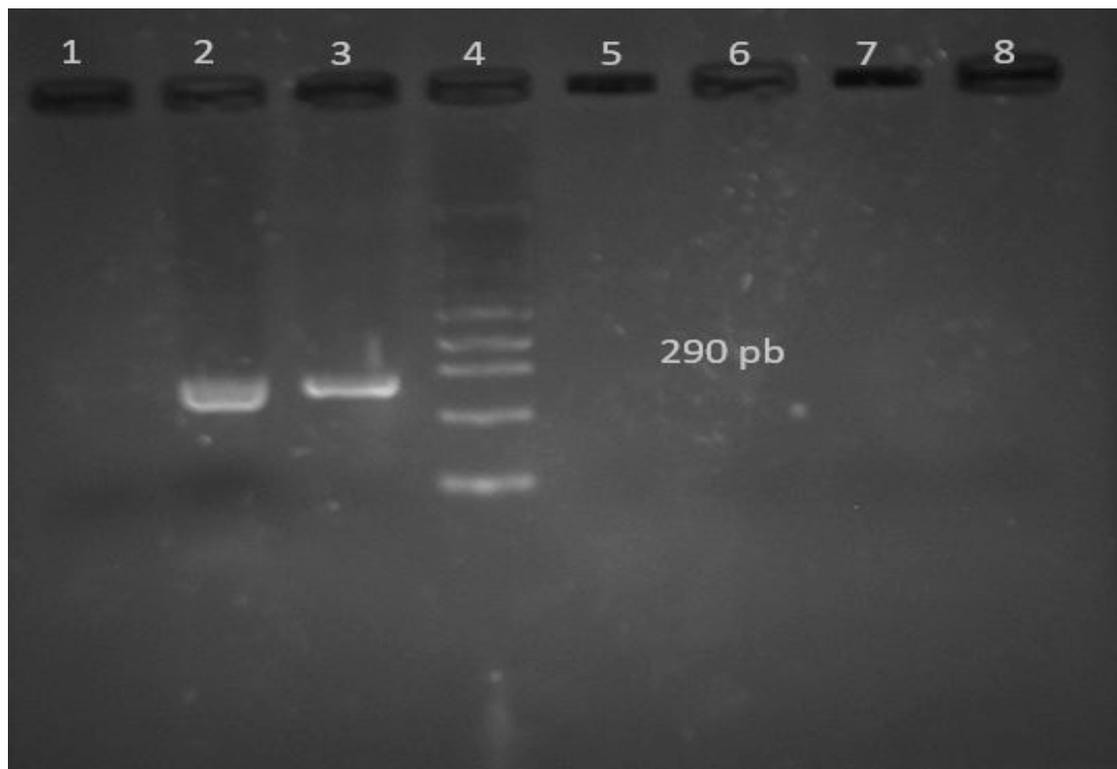


Figura 10. Detección del gen *traT* por PCR (amplicón de 290 pb). Carriles 2-3, *traT* en cepas de *E. coli* de pacientes; carril 4, marcador de peso molecular (MWM;100 pb); carril 8 control negativo (sin DNA molde).

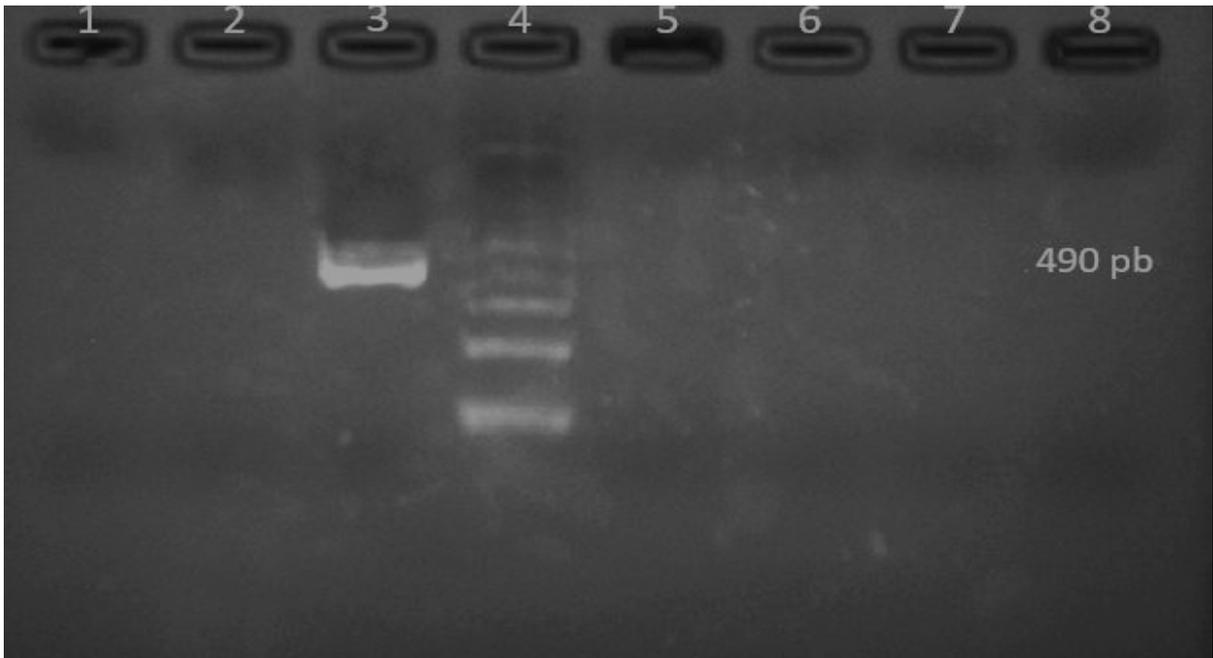


Figura 11. Detección del gen *cnfl* por PCR (amplicón de 490 pb). Carril 3, *cnfl* en cepa de *E. coli* de un paciente; carril 4 marcador de peso molecular (MWM;100 pb); carriles 1-2 y 5-7 cepas negativas para el gen; carril 8, control negativo (sin DNA molde).

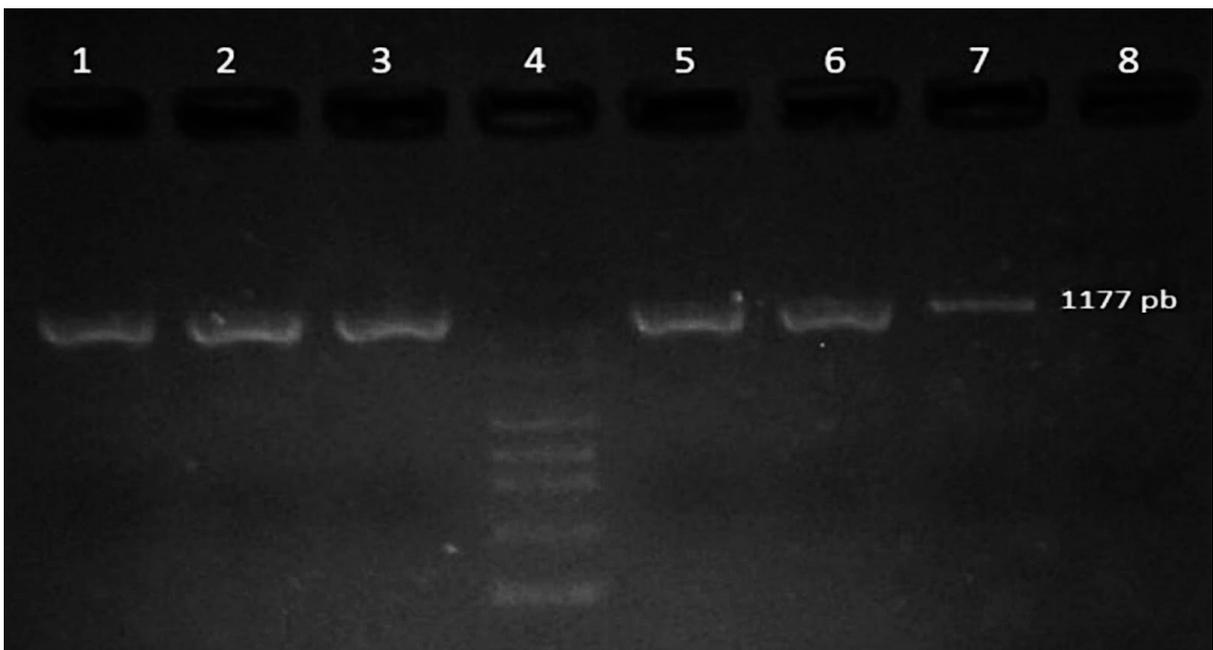


Figura 12. Detección del gen *hylA* por PCR (amplicón de 1177 pb). Carril 1-3 y 5-6, *hylA* en cepas de *E. coli* de pacientes; carril 4 marcador de peso molecular (MWM;100 pb); carril 7, control positivo (cepa clínica de *E. coli* portadora del gen). carril 8, control negativo (sin DNA molde).

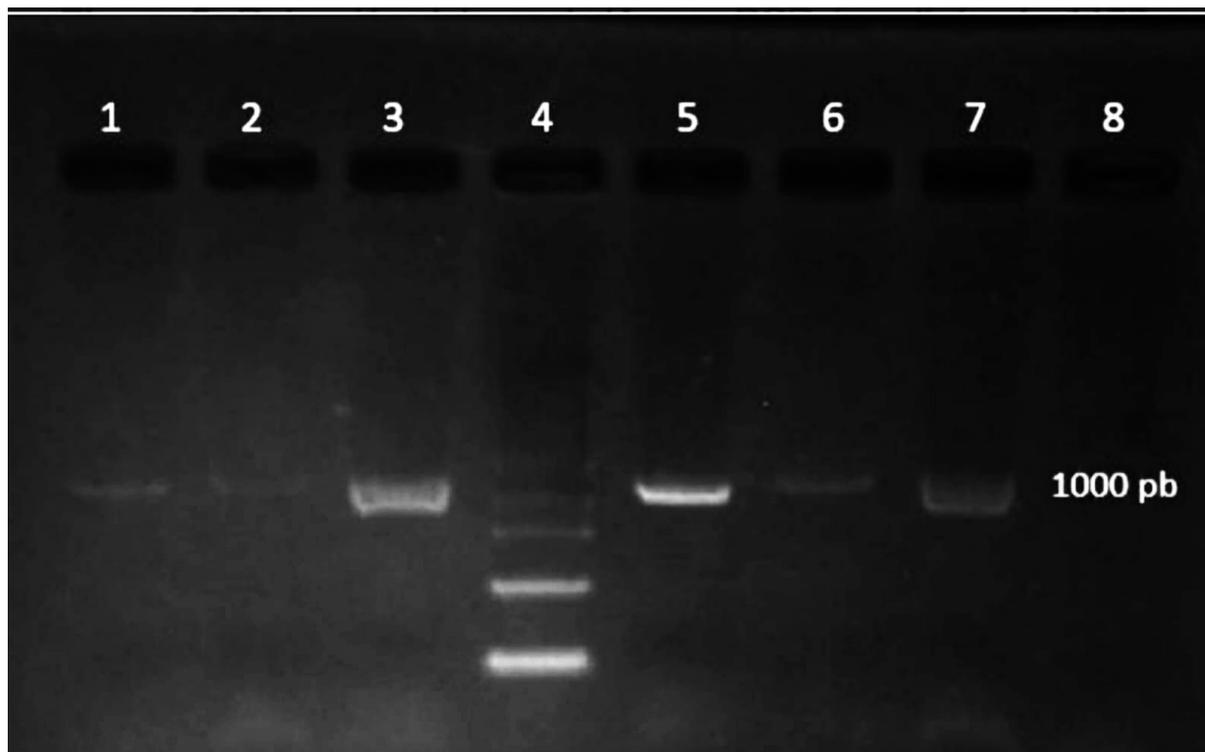


Figura 13. Detección del gen *usp* por PCR (amplicón de 1000 pb). Carril 1-3 y 5-6, *usp* en cepa de *E. coli* de pacientes; carril 4 marcador de peso molecular (MWM;100 pb); carril 7, control positivo (cepa clínica de *E. coli* portadora del gen). carril 8, control negativo (sin DNA molde).

Frecuencia de expresión de los genes de virulencia de *E. coli* relacionados a la enfermedad periodontal.

En la Tabla 4 se observan los porcentajes de expresión de los genes de virulencia de las cepas de *E. coli* periodontales (n=5) bajo crecimiento en caldo nutritivo infusión-cerebro-corazón (BHI), y caldo de soya tripticaseína (ST). Los genes *kpsMT II* (figura 14) y *traT* (figura 15) se expresaron en el 33.3% (n=1) de las cepas de pacientes con periodontitis moderada y en el 50% (n=1) de las cepas asociadas a periodontitis crónica, en cada caso, mientras que los genes de toxinas *hlyA* (figura 16) y *usp* (figura 17) se expresaron en todas las cepas, tanto de los pacientes con periodontitis moderada como de la crónica.

Gen	Función	Periodontitis moderada (n=3) No. (%)		Periodontitis crónica(n=2) No. (%)		TOTAL (n=5) No. (%)
		BHI	S.T	BHI	S.T	
<i>kpsMT II</i>	<u>Protectinas</u>	1 (33.3)	1(33.3)	1(50)	1(50)	2 (40)
<i>traT</i>		1 (33.3)	1(33.3)	1(50)	1(50)	2 (40)
<i>cnfI</i>	<u>Toxinas</u>					
<i>hlyA</i>		3(100)	3(100)	2 (100)	2(100)	5 (100)
<i>usp</i>		3(100)	3(100)	2 (100)	2(100)	5 (100)

Tabla 4. Frecuencia de expresión de los marcadores de virulencia de las cepas de *E.coli* periodontales.

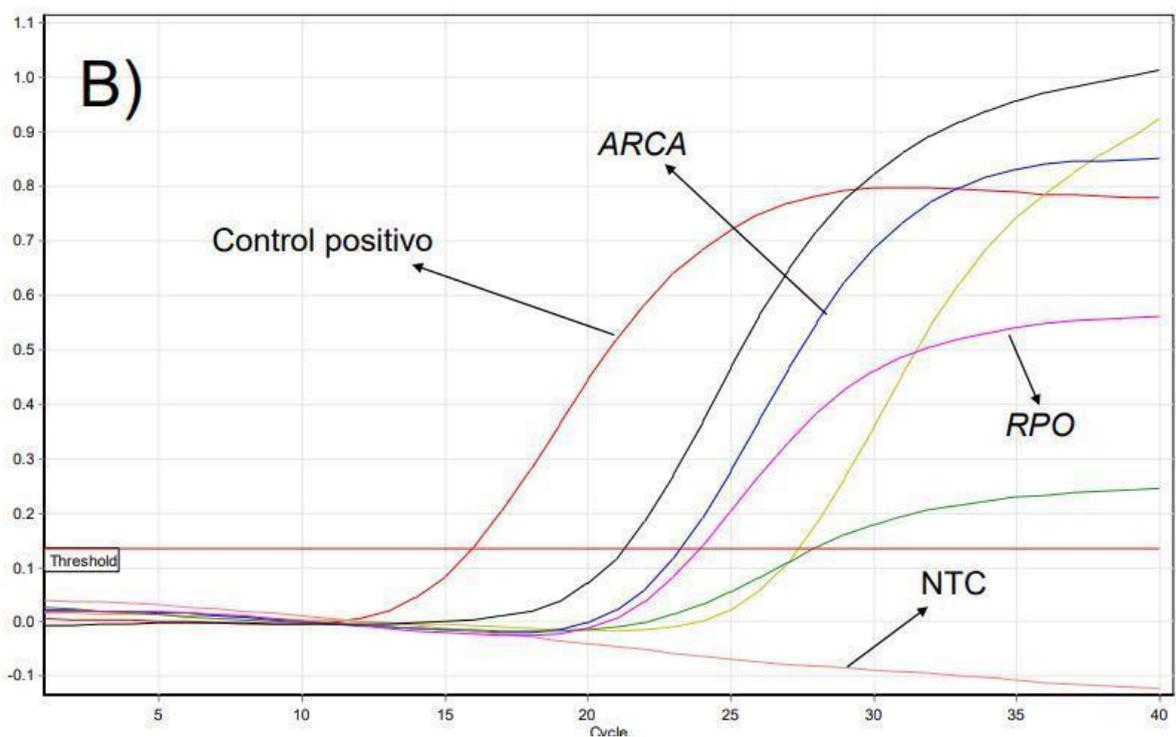
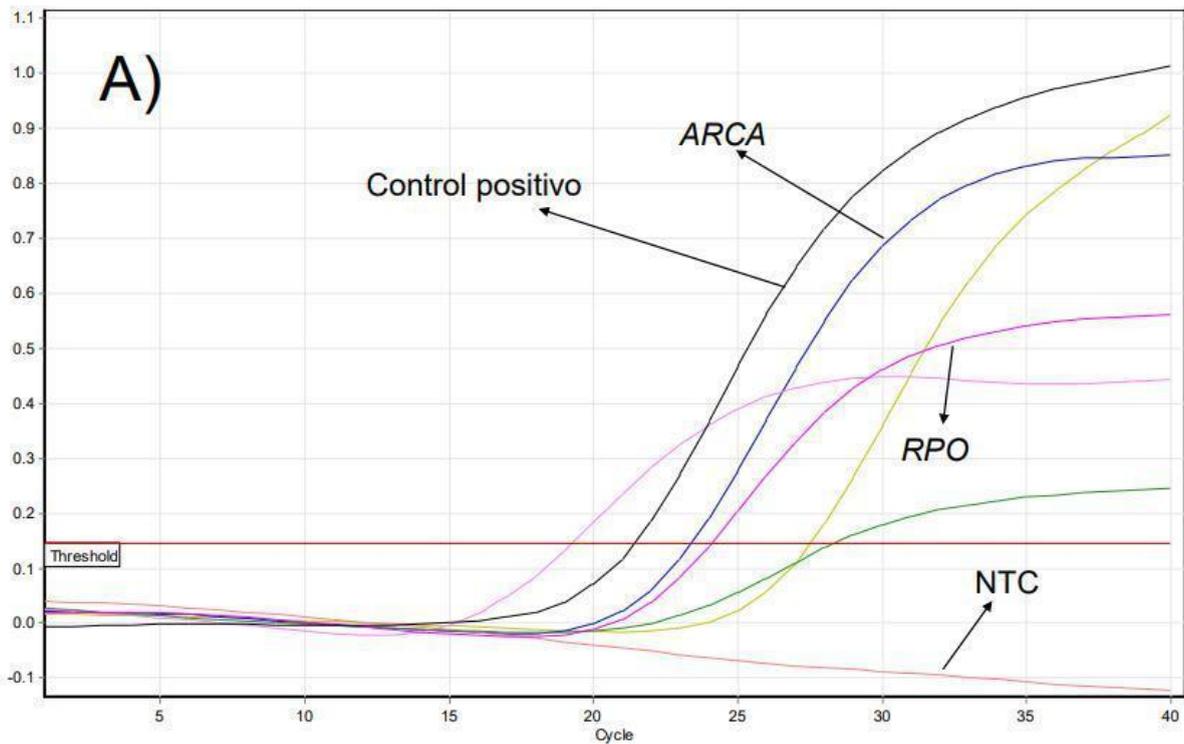


Figura 14. Detección de la expresión del gen *kpsMT II* en cepas aisladas de pacientes con enfermedad periodontal por PCR en tiempo real. A) Crecimiento en BHI, B) Crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *kpsMT II*; NTC: (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

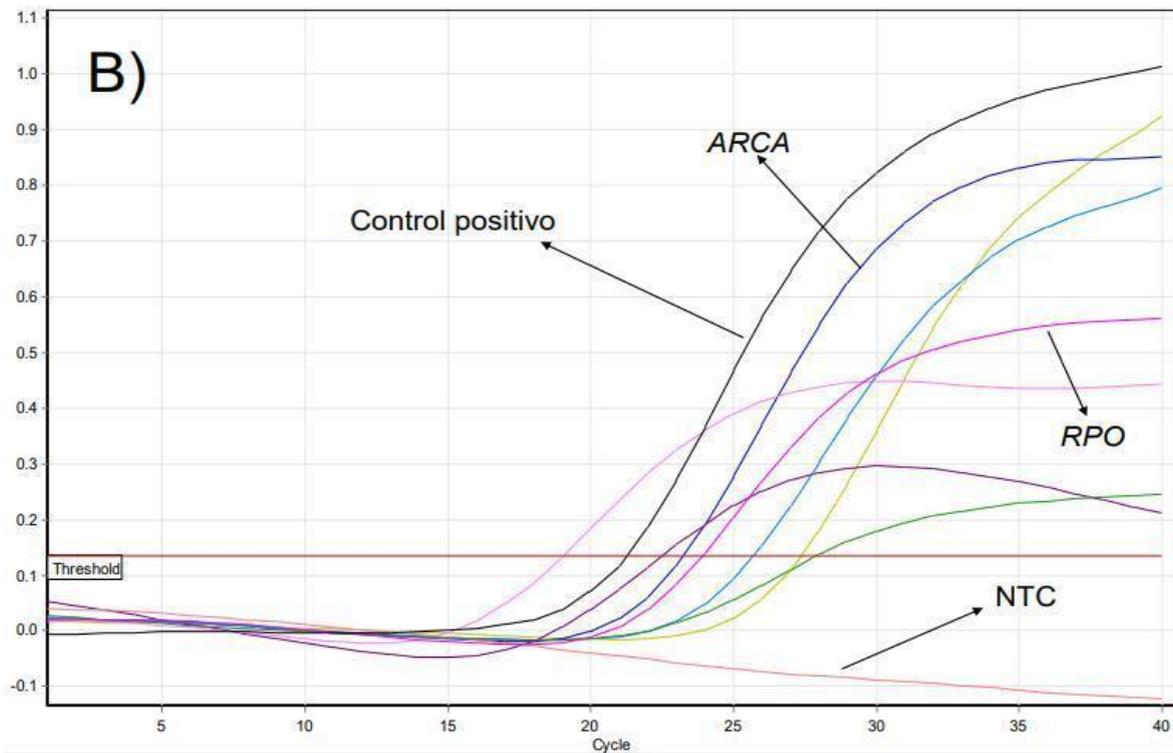
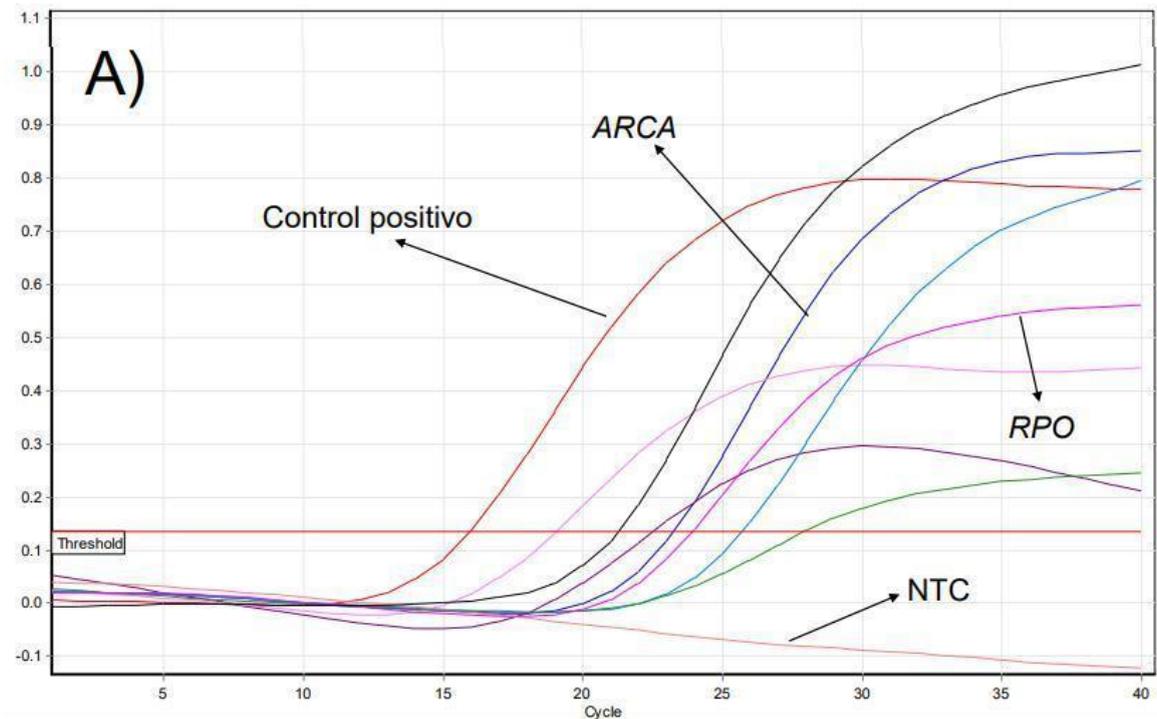


Figura 15. Detección de la expresión del gen *traT* en cepas aisladas de pacientes con enfermedad periodontal por PCR en tiempo real. A) Crecimiento en BHI, B) Crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *traT*; NTC: (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

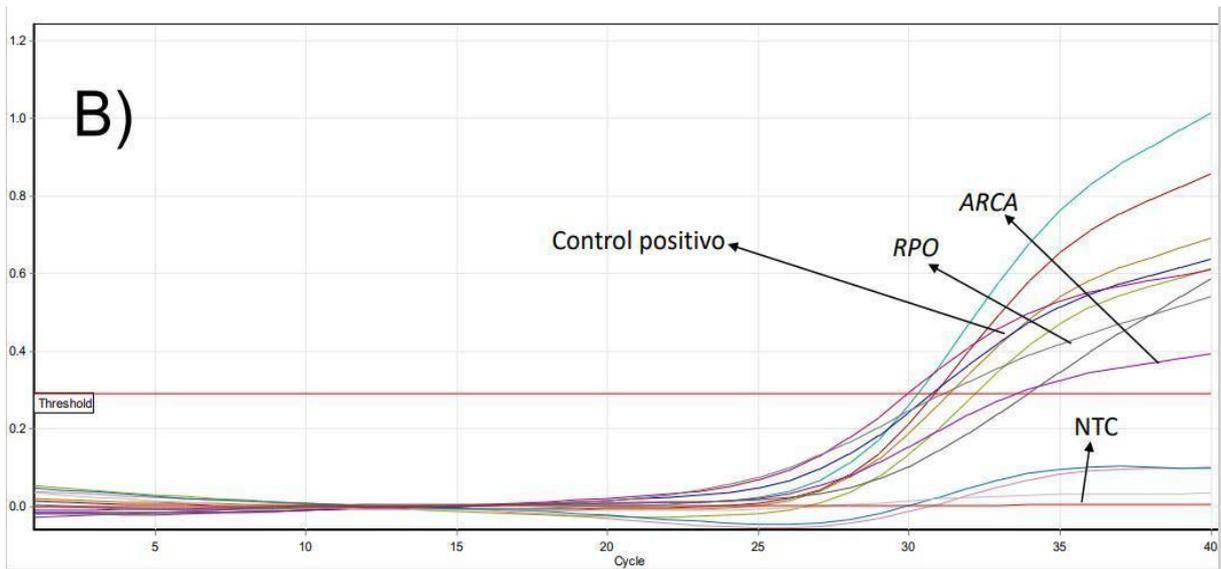
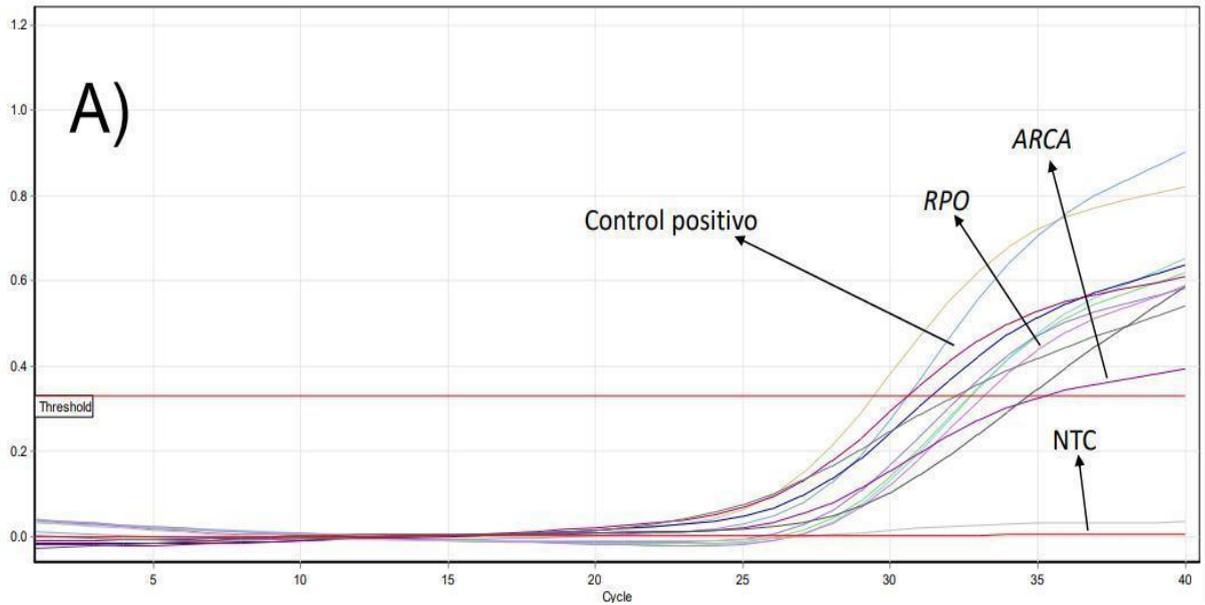


Figura 16. Detección de la expresión del gen *hylA* en cepas aisladas de pacientes con enfermedad periodontal por PCR en tiempo real. A) Crecimiento en BHI, B) Crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *hylA*; NTC: (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

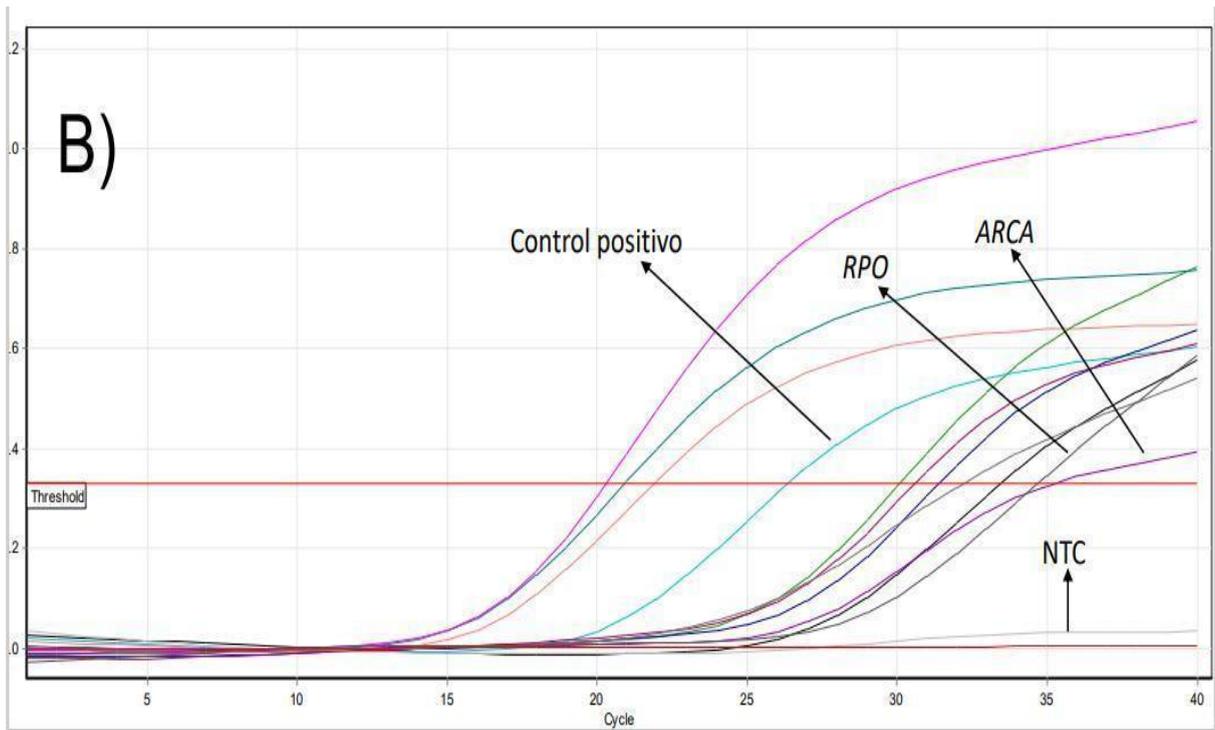
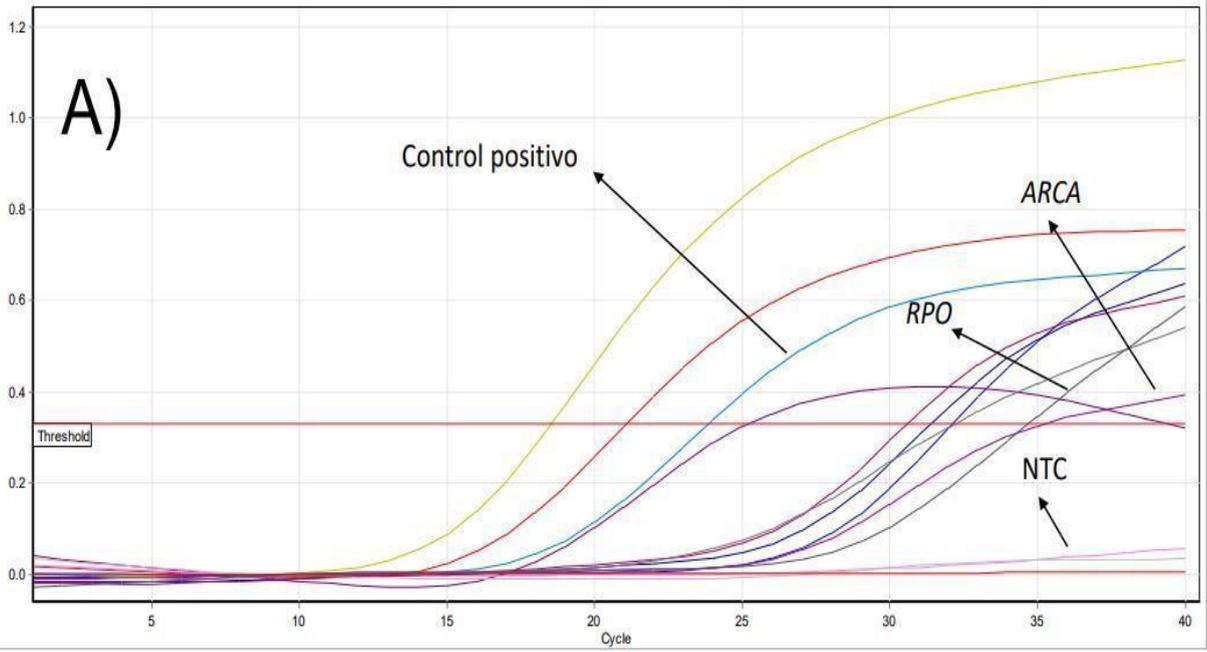


Figura 17. Detección de la expresión del gen *usp* en cepas aisladas de pacientes con enfermedad periodontal por PCR en tiempo real. A) Crecimiento en BHI, B) Crecimiento en ST. La fluorescencia se leyó a 60°C en el canal verde. Control positivo: cepa de *E. coli* portadora del gen *usp*; NTC: (No control template). Controles internos (*RPO* y *ARCA*).

DISCUSIÓN

Origen de las cepas

En este estudio se analizaron molecularmente 5 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes (mujeres y hombres; Figura 3) de la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala con periodontitis moderada (n=3) y periodontitis crónica (n=2; Tabla 3). La enfermedad periodontal en nuestro país se ha reportado hasta en 70 por ciento de la población y se presenta principalmente en adultos mayores (de 65 años en adelante) según la Academia Americana de Periodoncia (AAP). Se ha descrito que una gran variedad de bacterias anaerobias Gram negativas causan enfermedad periodontal (Dahlen *et al.*, 2019), por ejemplo en un estudio realizado en Colombia en 76 pacientes con periodontitis crónica, se encontró que los microorganismos con mayor frecuencia fueron *P. gingivalis* (64,4%), *F. nucleatum* (46,3 %) y *P. intermedia/nigrescens* (44,3%), además, se observaron bacilos entéricos Gram-negativos en 20 (26.31%) de 76 pacientes (Medina *et al.*, 2012). La presencia de otras bacterias patógenas no orales, como *E. coli*, se han identificado como colonizadores secundarios relacionados con la enfermedad periodontal (Da Silva *et al.*, 2011).

Detección de los genes de virulencia

Las toxinas bacterianas provocan daño celular en los tejidos del hospedero, facilitando la captación de nutrientes y por ende la multiplicación y la diseminación bacteriana, incrementando de esta manera, la agudeza de la periodontitis. El análisis molecular de *E. coli* como patógeno emergente secundario asociado a la periodontitis no ha sido estudiado. Los genes *hlyA* y *usp* se detectaron en el 100% (n=5) de las cepas periodontales de *E. coli* (Tabla 3), mientras que *cnfl* solo se identificó en el 20% (n=1) de las cepas asociadas a periodontitis moderada. El porcentaje de *hlyA* y *usp* de las cepas periodontales es superior a lo descrito en un estudio en el que se analizó un grupo de cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC; n=64) aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (n=15) y con bacteriuria asintomática (n=4), dentro de las cuales, el 20.3% (n=13) fue portadora de *hlyA*, y el 21.9 % (n=14) de *usp* (Yun KW *et al.*, 2017), mientras que en otro amplio estudio realizado en cepas uropatógenas de *E. coli* (UPEC; n=194) se encontró que el 15.4% (n=30), 7.2% (n=14) y 87.1% (n=169) fueron portadores de *hlyA*, *cnfl* y *usp*, respectivamente (Paniagua-Contreras *et al.*, 2017). Por otro lado la frecuencia de *usp* detectada en las cepas periodontales (100%; tabla 3) es

semejante al 100% y al 64%, descrito en cepas UPEC obtenidas de pacientes con prostatitis y cistitis, respectivamente (Morales-Espinosa *et al.*, 2016). La frecuencia de *hlyA*, y *cnfI* encontrada en este estudio también contrasta con la reportada en cepas de *E. coli* (n=200) aisladas de pacientes con infecciones cérvico-vaginales, donde el 23% (n=46) de las cepas acarreo *hlyA* y el 33% (n=66) *cnfI* (Paniagua-Contreras *et al.*, 2019). La elevada presencia de los genes de toxinas en las cepas periodontales de *E. coli* evidencia la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones más agudas, debido a que se ha descrito que *hlyA* degrada paxilina, una proteína andamio del citoesqueleto, y otras proteínas involucradas en la cascada de señalización de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), interfiriendo con la señal pro inflamatoria mediada por este complejo proteico, amortiguando así la respuesta inmune del hospedero a la infección (Dhakal y Mulvey, 2012).

Expresión de los genes de virulencia

En este trabajo no se encontraron diferencias en los porcentajes de expresión de los genes de toxinas y de protectinas en las cepas periodontales de *E. coli* (n=5) con respecto al medio enriquecido infusión cerebro-corazón (BHI) y caldo de soya tripticaseína (ST) (Tabla 4). Los genes que codifican para toxinas *hlyA* y *usp* se expresaron en todas las cepas (100 % n=5) de periodontitis moderada y crónica después del crecimiento en el medio BHI y caldo ST. Las toxinas son moléculas clínicamente relevantes porque causan daño tisular en el huésped, facilitan la liberación de nutrientes y la propagación bacteriana, e inactivan las células efectoras del sistema inmunitario (Lüthjeb 2014). La expresión de los genes de virulencia en las cepas periodontales de *E. coli* no se había estudiado, sin embargo los porcentajes de expresión detectados en este trabajo contrastan con los descritos en un estudio realizado en cepas uropatógenas de *E. coli*, donde la expresión de genes que codifican para toxinas después de la infección en un modelo *in vitro* utilizando una línea celular vaginal A431 fue para *hlyA* de 11.8% (n=23) y *usp* de 68% (n=132; Paniagua-Contreras *et al.*, 2016). En este estudio el gen *cnfI* de *E. coli* no fue expresado después del crecimiento en los medios de BHI o ST, lo cual discrepa con el resultado descrito en un estudio realizado en un grupo de cepas de *E. coli* cérvico-vaginales (n=200), donde la expresión de *cnfI* fue del 33.5 (n=67) después de la infección de la línea celular vaginal A43 con las cepas de *E. coli*.

Se ha descrito que el gen *kpsMT* de *E. coli* que codifica para el antígeno K es importante para los patógenos bacterianos invasivos, ya que les permite evadir las defensas innatas del hospedero como la fagocitosis (Weiss *et al.*, 1982). El gen capsular *kpsMT* suele ser más

prevalente en las cepas UPEC asociadas con pielonefritis que en las cepas asociadas con infecciones del tracto urinario (Jann 1992). La producción de la cápsula incrementa los efectos bactericidas del suero humano (Buckles *et al.*, 2009). En este estudio los genes *kpsMT II* (figura 9, 14, tabla 4) y *traT* (figura 10, 15, tabla 4) se expresaron en el 100% (n=2) de las cepas, en cada caso, después del crecimiento en los medios de BHI o ST. La frecuencia de expresión de *kpsMT II* en las cepas periodontales es semejante al 61.3% (n=119) identificado en un grupo de cepas UPEC (n=194) descrito por Paniagua *et al.*,(2017) durante un modelo in vitro de infección y también coincide con el 72.5% (n=145) identificado en cepas de *E. coli* cérvico-vaginales (n=200) aisladas de mujeres con infecciones vaginales ocasionales, recurrentes y crónicas.

La expresión colectiva de los genes de protectinas *kpsMT II* y *traT*, así como de los genes de toxinas *hlyA* y *usp* identificado en las cepas periodontales de *E. coli* demuestra la virulencia de las cepas para ocasionar infecciones periodontales agudas y/o crónicas, debido a que con la formación de la cápsula por un lado pueden evadir la respuesta inmune del hospedero y resistir la acción de los antibióticos, y por otro lado pueden incrementar el daño a los tejidos mediante la acción de los genes de las toxinas *hlyA* y *usp*.

CONCLUSIONES

1. La mayoría de las cepas de *E. coli* analizadas provinieron de mujeres de la tercera edad con periodontitis moderada.
2. Los genes de toxinas (*hylA*, y *usp*), y de protectinas (*kpsMT II* y *traT*) se detectaron y expresaron en todas las cepas de *E. coli* de los pacientes con enfermedad periodontal, indistintamente del crecimiento en el caldo nutritivo de cultivo.
3. El gen de la toxina *cnf-I* se identificó en una cepa de un paciente con periodontitis moderada, pero no se expresó durante el crecimiento en los caldos nutritivos de cultivo.
4. La frecuencia y expresión de los genes de protectinas y toxinas en las cepas de *E. coli* pueden incrementar la agudeza y/o cronicidad de las infecciones periodontales

REFERENCIAS

1. Abe CM, Salvador FA, Falsetti IN, Vieira MAM, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado AMO, Elias WP, Hernandez RT, Gomes TAT. 2008. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol. 52: 397-406
2. Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J, Hultgren SJ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. 2003. Science. 301(5629):105-107.
3. Armitage G. Development of a Classification System for Periodontal Diseases and Conditions. 1999. Ann Periodontol. 4:1-6.
4. Barber AE, Norton JP, Wiles TJ, Mulvey MA. 2016. Strengths and Limitations of Model Systems for the Study of Urinary Tract Infections and Related Pathologies. Microbiol Mol Biol Rev. 80(2): 351- 67.
5. Bascones-Martínez A, Figuero-Ruiz E, 2004. Periodontal diseases as bacterial infection. Méd Oral Patol Oral Cir Bucal. 9; 92–107.
6. Bascones Martínez A. & Figuero Ruiz E. 2005. Las enfermedades periodontales como infecciones bacterianas. Avances en Period Implant Oral. 17(3); 147-156.
7. Bosshardt DD, Lang NP, 2005. The junctional epithelium: from health to disease. J Dent Res. 84; 9–20
8. Buckles EL, Wang X, Lane MC, Lockett CV, Johnson DE, Rasko DA. 2009. Role of the K2 capsule in *Escherichia coli* urinary tract infection and serum resistance. J Infect Dis. 199(11): 1689-1697.
9. Botero JE, Bedoya E. 2010. Determinantes del diagnóstico periodontal. Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil Oral. 3(2): 94-99.
10. Corbett D, Roberts IS. 2008. Capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. Adv Appl Microbiol. 65:1-26.
11. Dahlen G, Basic A, Bylund J. 2019. Importance of virulence factors for the persistence of oral bacteria in the inflamed gingival crevice and in the pathogenesis of periodontal disease. J Clin Med. 8(9):1339.
12. Da Silva BCM, Do SRM, Luiz RR, Colombo AP. 2011. Association of red complex, *A. actinomycetemcomitans* and non-oral bacteria with periodontal diseases. Arch Oral Biol. 56(9):899-906.
13. Dhakal BK, Mulvey MA. 2012. The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. Cell Host Microbe. 11(1):58-69.

14. Etienne-Manneville S, Hall A. 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature*. 420(6916):629-635.
15. Flatau G, Lemichez E, Gauthier M, Chardin P, Paris S, Fiorentini C, Boquet P. 2010. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. *Nature*. 1997 Jun 12;387(6634):729-33. Pennington H. *Escherichia coli* O157. *Lancet*. 376 (9750):1428-1435.
16. Felmlee T, Pellett S, Lee EY, Welch RA. 1985. *Escherichia coli* hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol*. 163(1): 88-93.
17. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. 2004. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 19;71–76
18. Issartel JP, Koronakis V, Hughes C. 1991. Activation of *Escherichia coli* prohaemolysin to the mature toxin by acyl carrier protein-dependent fatty acylation. *Nature*. 351 (6329): 759-761.
19. Jann K, Jann B. 1992. Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can J Microbiol*. 38(7):705–710.
20. Kolenbrander PE, 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions and genetic systems. *Annu. Rev. Microbiol*. 54; 413–437.
21. Page RC, Kornman KS. 1997. The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontol* 2000.14: 33-40.
22. Koronakis V, Li J, Koronakis E, Stauffer K. 1997. Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol* 23(3): 617-626.
23. Lüthje P, Brauner A. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* and their interaction with the host. *Adv Microbiol Physiol*. 65:337-372.
24. Nipic D, Podlesek Z, Budic M, Crnigoj M, Zgur-Bertok D. 2013. *Escherichia coli* uropathogenic-specific protein, Usp, is a bacteriocin-like genotoxin. *J Infect Dis* 208:1545-1552.
25. Momtaz H, Karimian A, Madani M, Safarpour Dehkordi F, Ranjbar R, Sarshar M, Souod. 2013. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: Serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 12;8.
26. Morales-Espinosa R, Hernández-Castro R, Delgado G, Mendez JL, Navarro A, Manjarrez A, Cravioto A. 2016. UPEC strain characterization isolated from Mexican patients with recurrent urinary tract infections. *J Infect Dev Ctries*. 10(4):317-328.

27. Millán Y, Hernández E, Millán B, Araque M. 2014. Distribución de grupos filogenéticos y factores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógena productora de β -lactamasa CTX-M-15 aisladas de pacientes de la comunidad en Mérida, Yucatán. *Revista Arg Microbiol.* 46: 175-181
28. Mills M, Meysick KC, Brien AD. 2000. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun.* 68:5869–80.
29. Nieto JM, Bailey MJ, Hughes C, Koronakis V. 1996. Suppression of transcription polarity in the *Escherichia coli* hemolysin operon by a short upstream element shared by polysaccharide and DNA transfer determinants. *Mol Microbiol.* 19(4): 705-13.
30. Organización Mundial de la Salud. 1997. World Health Organization. Oral health surveys. Basic methods. Geneva (Switzerland): World Health Organization.
31. Paniagua-Contreras GL, Hernández-Jaimes T, Monroy-Pérez E, Vaca-Paniagua F, Díaz-Velásquez C, Uribe-García A, Vaca S. 2017. Comprehensive expression analysis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microb Pathog.* 103:1-7.
32. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Rodríguez-Moctezuma JR, Domínguez-Trejo P, Vaca-Paniagua F, Vaca S. 2015. Virulence factors, antibiotic resistance phenotypes and O-serogroups of *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infection patients in Mexico. *J Microbiol Immunol Infect.* pii: S1684-1182(15)00827-0.
33. Paniagua-Contreras GL, Monroy-Pérez E, Solís RR, Cerón AB, García Cortés LR, Alonso NN, Camarillo DH, Arreygue LS, Domínguez-Trejo P, Velásquez CD, Vaca-Paniagua F, Uribe-García A, Vaca S. 2019. O-serogroups of multi-drug resistant cervicovaginal *Escherichia coli* harboring a battery of virulence genes. *J Infect Chemother.* 25(7):494-497.
34. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. 2005. Periodontal diseases. *Lancet.* 366; 1809–1820.
35. Pitout J. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance. 2012. *Front Microbiol.* 3, 9.
36. Rosan B, Lamont RJ. 2000. Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2;1599–1607.
37. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira Jr., JF, Benno Y. 2006. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol.* 21; 112–122.
38. Rijavec M, Müller-Premru M, Zakotnik B, Zgur-Bertok D. 2008. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *J Med Microbiol.* 57(Pt 11):1329- 1334.
39. Subashchandrabose S, Mobley HL. 2015. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr.* 3(4).

40. Vimont S, Boyd A, Bleibtreu A, Bens M, Goujon JM, Garry L, Clermont O, Denamur E, Arlet G, Vandewalle A. 2012. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* clone O25b:H4-ST131 has high intestine colonization and urinary tract infection abilities. PLoS ONE. 7;9.
41. Tarchouna M, Ferjani A, Ben-Selma W, Boukadida J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. International J. Infect. Dis. 17: 450-453
42. Toval F, Köhler CD, Vogel U, Wagenlehner F, Mellmann A, Fruth A, Schmidt MA, Karch H, Bielaszewska M, Dobrindt U. 2014. Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. J Clin Microb. 52;407-418
43. Yamamoto S, Terai A, Yuri K, Kurazono H, Takeda Y, Yoshida O. 1995. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. FEMS Immunol Med Microbiol 12(2):85–90.
44. Yun KW, Kim HY, Park HK, Kim W, Lim IS. 2014. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* of urinary tract infections and asymptomatic bacteriuria in children. J Microbiol Immunol Infect. 47(6):455-61.
45. Weiss J, Victor M, Cross AS, Elsbach P. 1982. Sensivity of K-1 encapsulated *Escherichia coli* to killing by the bactericidal permeability- increasing protein of rabbit and human-neutrophils. Infect Immun. 38(3):1149-1153.