



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**Expresión de genes de virulencia en cepas
periodontales de *Escherichia coli***

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

ANDREA DE LIRA SILVA

DIRECTOR DE TESIS

DR. ERIC MONROY PÉREZ



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Dedicatoria

El presente trabajo se lo quiero dedicar a mi familia, principalmente a mis padres Arturo y Guadalupe que a lo largo de todos estos años me han brindado su apoyo y amor incondicional, lo que me ha permitido llegar hasta donde estoy el día de hoy. También quiero agradecer a mis hermanos Miguel Ángel y José Carlo por ser una parte fundamental en mi vida y porque gracias a todos ustedes y sus contantes motivaciones he logrado cumplir una meta más en mi vida, los amo con todo mi ser.

A mi tía Malena por siempre estar al pendiente de nosotros y por siempre llenarnos con sus gestos y detalles de inmenso cariño.

A la memoria de mi abuelo Constantino Silva, que nos dejó hace apenas unos cuantos meses, sé que estaría orgulloso de su Groserita, con todo mi amor hasta dónde estes.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por brindarme un lugar y permitirme desarrollarme en el ámbito académico, por todos los profesores que se cruzaron en mi camino a lo largo de estos años, por todos los bellos recuerdos que creé y por las amistades que hice a lo largo de esta increíble carrera.

A la doctora Gloria Luz Paniagua Contreras por la confianza al aceptarme en su laboratorio, por todas sus enseñanzas tanto en el salón de clases como en el laboratorio y por sus constantes motivaciones de siempre salir adelante y nunca conformarnos.

A mi director de tesis, al doctor Eric Monroy Pérez que a lo largo de este proyecto estuvo siempre pendiente, compartiéndonos su conocimiento con mucha paciencia y dedicación, resolviendo dudas siempre que alguna surgía en el laboratorio.

A Paty y a Susa, por brindarnos apoyo siempre que lo necesitábamos, por compartir sus enseñanzas, por hacer que todas las horas de laboratorio fueran muy amenas, por todas las risas y sobre todo por enseñarnos lo que es el trabajo en equipo.

A los amigos que hice en el laboratorio, a Alexa, Dana, Sam, Lore, Karen y Alan, por hacer del laboratorio un lugar muy divertido, por su apoyo y compañía.

A todos los amigos que hice a lo largo de la carrera, pero sobre todo a Vania, Shiba y Daniel San quienes fueron un gran apoyo a lo largo de la carrera, por todas las experiencias que hemos vivido juntos, las infinitas risas y por ser mi equipo desde el día uno, los quiero mucho.

ÍNDICE

RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN.....	6
Enfermedad periodontal.....	6
Gingivitis.....	7
Periodontitis.....	9
<i>Escherichia coli</i>	11
Factores de virulencia	13
Adhesinas	13
Cápsula	14
Sistema de adquisición de hierro	14
Toxinas	14
Protectinas	15
Islas de patogenicidad.....	15
Genes de virulencia	15
JUSTIFICACIÓN	18
ANTECEDENTES	19
OBJETIVOS	22
MATERIAL Y MÉTODOS	23
Origen de las cepas	23
Resiembra de las cepas y extracción de DNA	23
Identificación de <i>E. coli</i> por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	23
Cultivo bacteriano para la extracción de RNAm	24
Extracción del RNA bacteriano.....	24
Reversotranscripción.....	25
Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en Tiempo Real	26
RESULTADOS	28
Pacientes estudiados.....	28
Detección de los genes de virulencia en las cepas de <i>E. coli</i>	30
Expresión de los genes de virulencia en las cepas de <i>E. coli</i>	30

Comparación de la expresión de los genes de acuerdo con el grado de enfermedad periodontal	50
Patrones de expresión de genes de virulencia de <i>E. coli</i> periodontal.	52
DISCUSIÓN.....	57
Pacientes estudiados.....	57
Expresión de genes de virulencia que codifican para adhesinas.	58
Expresión de genes de virulencia que codifican para toxinas.....	59
Expresión de genes de virulencia que codifican para sistemas de adquisición de hierro (sideróforos).....	59
Expresión de genes de virulencia que codifican para protectinas.....	60
Expresión de genes de virulencia que codifican para islas de patogenicidad.....	61
Patrones de expresión de genes en cepas de <i>E. coli</i>	61
CONCLUSIONES	63
REFERENCIAS.....	64

RESUMEN

La periodontitis es una enfermedad crónica inflamatoria ocasionada por la acumulación de bacterias anaerobias Gramnegativas que promueven el desarrollo de bolsas periodontales y con el tiempo ocasionan la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes. Recientemente se ha descrito a *Escherichia coli* como un patógeno emergente secundario asociado a las infecciones periodontales. La patogenicidad de *E. coli* se debe a la gran cantidad de genes de virulencia que posee, y que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, protectinas y toxinas. Es frecuente que estos genes se encuentren en islas de patogenicidad (PAIs). El objetivo de este estudio fue analizar la expresión de los genes de virulencia en un grupo de cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal. Se analizaron 100 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal, atendidos en la Clínica de Endoperiodontología de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala. Las cepas de *E. coli* fueron identificadas por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) de punto final mediante la amplificación del gen 16S rRNA. Después del modelo *in vitro* de infección de las células epiteliales humanas derivadas de cáncer de pulmón de la línea celular A549 con cada una de las cepas de *E. coli*, se realizó la extracción del ARN utilizando el aparato robotizado QuiaCube y el kit comercial RNeasy (Qiagen). La revertotranscripción de RNA a DNAc se realizó utilizando el kit comercial Quantitect reverse transcription (Qiagen). La determinación de la expresión de los genes de virulencia se realizó por PCR en tiempo real. Los genes de adhesión expresados con mayor frecuencia fueron; *fim* (48%) e *iha* (37%), de toxinas; *usp* (33%), de adquisición de hierro; *feoB* (84%), *fyuA* (62%) e *irp2* (61%), y de protectinas; *traT* (50%), *kpsMT* (35%) y *ompT* (28%). El 45% de las cepas de *E. coli* fue portadora del gen *malX* (PAIs). Las cepas de *E. coli* fueron capaces de expresar simultáneamente los genes de adhesión, toxinas, sideróforos y protectinas durante la infección de la línea celular pulmonar, lo que podría incrementar la agudeza y/o cronicidad de la enfermedad periodontal.

INTRODUCCIÓN

Enfermedad periodontal

La enfermedad periodontal es una afección inflamatoria crónica caracterizada por la degradación progresiva de las encías y los tejidos conectivos circundantes, provocando la pérdida de inserción, afectando de manera significativa el ligamento periodontal, cemento y la destrucción del hueso alveolar (Fig. 1), ocasionando con el tiempo la pérdida de los dientes (Botero, 2010; Highfield, 2009). La enfermedad periodontal se caracteriza por ser multifactorial, pero siendo la causa principal la acumulación de la biopelícula bacteriana altamente patógena, conocida como placa dental, en la superficie de los dientes, que desencadena una respuesta inmune-inflamatoria del hospedero, conduciendo a la progresión de la enfermedad, alimentada principalmente por los carbohidratos de la dieta (Khan, 2023; Vieira, 2016; Taboada, 2018).



Figura 1. Periodonto. Tomado de Ortiz-Vigón, 2018.

Enfermedad periodontal es un término genérico para referirse a las diversas enfermedades que afectan al periodonto. Las enfermedades periodontales son diversas y entre las más comunes encontramos a la gingivitis y periodontitis. Cada una tiene variedades o tipos, estadios o fases y grados de severidad (Taboada, 2018).

El diagnóstico clínico se hace mediante el reconocimiento de diversos signos y síntomas en los tejidos periodontales que presagian un deterioro de la salud. El periodonto sano (Fig. 2), del cual solo se observa los tejidos gingivales, describiéndolos como rosa pálido, con un margen gingival que se ubica en la unión cemento-esmalte (Highfield, 2009).



Figura 2. Encías clínicamente sanas. Tomado de Matesanz, 2008.

Gingivitis

La clasificación de las enfermedades periodontales comienza con la gingivitis que fue definido por Page y Schroeder en 1976 como “lesión inicial”, teniendo presente que solo vamos a encontrar signos y síntomas sobre la encía. Clínicamente se aprecia una encía inflamada, con un contorno gingival alargado debido a la existencia de edema, una coloración roja o azulada, una temperatura surcular elevada, sangrado al sondaje y un incremento del sangrado gingival. Estos signos están asociados a periodontos sin pérdidas de inserción o estables y según la localización en la encía la gingivitis se clasifica como:

- Generalizada: si está afectando todos los dientes (Fig. 3).
- Localizada: si está alterando la encía que rodea a un grupo determinado o a un solo diente (Fig. 4) (Matesanz, 2008).



Figura 3. Gingivitis generalizada. Tomado de Matesanz, 2008.



Figura 4. Gingivitis localizada. Tomado de Highfield, 2009.

La gingivitis puede ser reversible siempre y cuando se trate adecuadamente, es decir, cura sin secuelas y sin pérdida de tejidos, pero, en caso de persistir durante un largo periodo de tiempo da lugar a un cuadro denominado gingivitis crónica, que puede propagarse al hueso del maxilar, al periodonto y al cemento, con la posibilidad de que se transforme en una periodontitis. La transición de gingivitis a periodontitis (Fig. 5) a menudo es fluida y es posible que pase desapercibida por el paciente por muchos años (Schäfer, 2011).

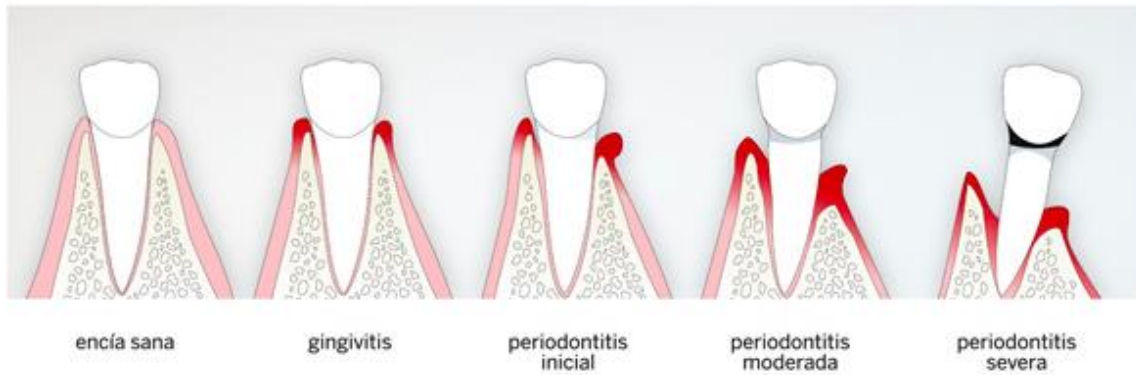


Figura 5. Evolución de la enfermedad periodontal. Tomado de Clínica Oliver Coll, 2018.

Periodontitis

La periodontitis es una infección grave que daña el tejido blando y que, sin tratamiento, puede llegar a destruir el hueso que sostiene los dientes, provocando que estos se aflojen o se pierdan. Las lesiones pueden ser tan graves que pueden alterar la función masticatoria, la estética y por consiguiente afectar el bienestar y calidad de vida de las personas (Mayo Clinic, 2020; Medina, 2010).

Puede presentar diversos signos y síntomas como edema, eritema, aumento o recesión de la encía, placa o cálculo supra y subgingival, aumento en el acumulo de placa, sangrado o supuración al sondaje o espontánea, una mayor movilidad dental, apiñamiento o exfoliación dental. Como resultado observamos la formación de la bolsa periodontal, pérdida de inserción y pérdida ósea radiográfica (Escudero, 2008).

La profundidad de sondaje y la pérdida de inserción clínica (Fig. 6) son dos de los parámetros más importantes para clasificar a la periodontitis, de igual manera su clasificación se establece en función de los siguientes criterios:

1. Extensión:

- Localizada: se presenta en menos de un 30% de sitios afectados
- Generalizada: se presenta en más de un 30% de sitios afectados

2. Severidad:

- Leve: la pérdida de inserción es de 1 a 2 milímetros.
- Moderada: la pérdida de inserción es de 3 a 4 milímetros.
- Severa o avanzada: la pérdida de inserción es superior a los 5 milímetros (Escudero, 2008).

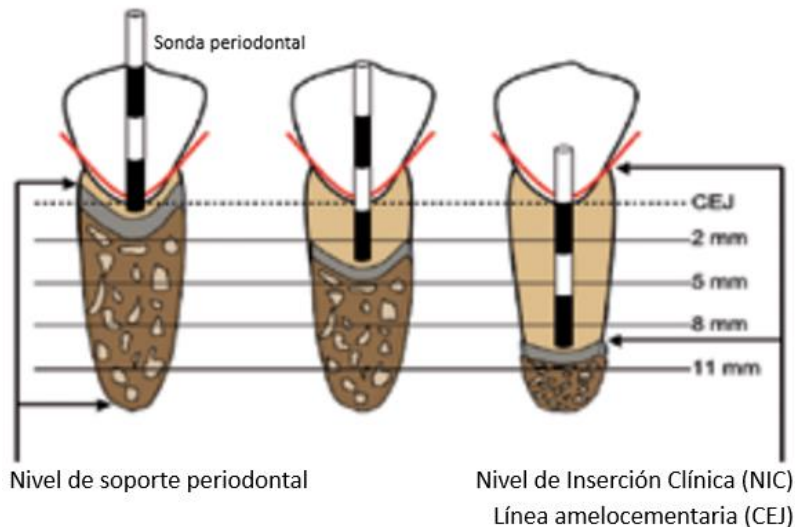


Figura 6. Esquema representativo de la relación entre el nivel de inserción clínica y el soporte periodontal. Tomado de Botero, 2010.

En la cavidad oral existen alrededor de 500 especies distintas de bacterias, de las que sólo unas pocas son responsables de la aparición de la periodontitis, existen diferentes bacterias anaerobias responsables de la enfermedad entre las que se encuentran: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Eikenella corrodens*, *Campylobacter rectus*, *Peptoestreptococo micros*, *Treponema denticola* y *Prevotella intermedius*, entre otras. Sin embargo, algunas investigaciones han demostrado que la frecuencia relativa de cada microorganismo varía entre poblaciones de diferentes orígenes geográficos, concluyendo que la prevalencia de patógenos periodontales específicos cambia entre individuos mismo ambiente entre distintas etnias y países. Además de los ya mencionados, en los ambientes subgingivales de algunos pacientes con periodontitis crónica, se han encontrado

otros microorganismos tales como las enterobacterias (Schäfer, 2011; Medina, 2010; Mombelli, 2000).

Recientemente se ha descrito a *Escherichia coli* como un patógeno emergente secundario asociado a infecciones periodontales.

Escherichia coli

Escherichia coli es una bacteria Gramnegativa, que pertenece a la familia de las enterobacterias, su morfología colonial en agar E.M.B. (por sus siglas en inglés: eosina azul de metileno) tiene un diámetro de 1 a 2 mm y se puede observar una coloración brillante verde metálica (Reyes, 2011).

La morfología microscópica es en forma de bacilos coliformes y miden aproximadamente 0.5 μm de ancho por 3 μm de largo. Microbiológicamente se caracterizan por no formar esporas, son aerobios o anaerobios facultativos, fermentan la glucosa, no producen oxidasa, y son móviles (flagelos peritricos) (Reyes, 2011). Poseen una capsula y una compleja pared celular (Fig. 7), la cual contiene de una a dos capas de peptidoglucano, lipoproteínas de anclaje y lipopolisacáridos (LPS) además de porinas que son canales de proteínas para la penetración de compuestos hidrofílicos. El LPS (Lipopolisacárido) está localizado en la membrana externa de la envoltura celular bacteriana, este constituye el antígeno O que comprende una zona más interna que contiene la molécula del lípido A de la que depende la actividad biológica de la endotoxina (Rojas, 1995). La presencia del LPS junto con otros factores, media la resistencia bacteriana al efecto bactericida del suero normal. Las cepas resistentes a la acción bactericida del suero sobreviven más tiempo en sangre y por ello causan infecciones hematógenas, diseminadas y más agresivas (Medina, 2010).

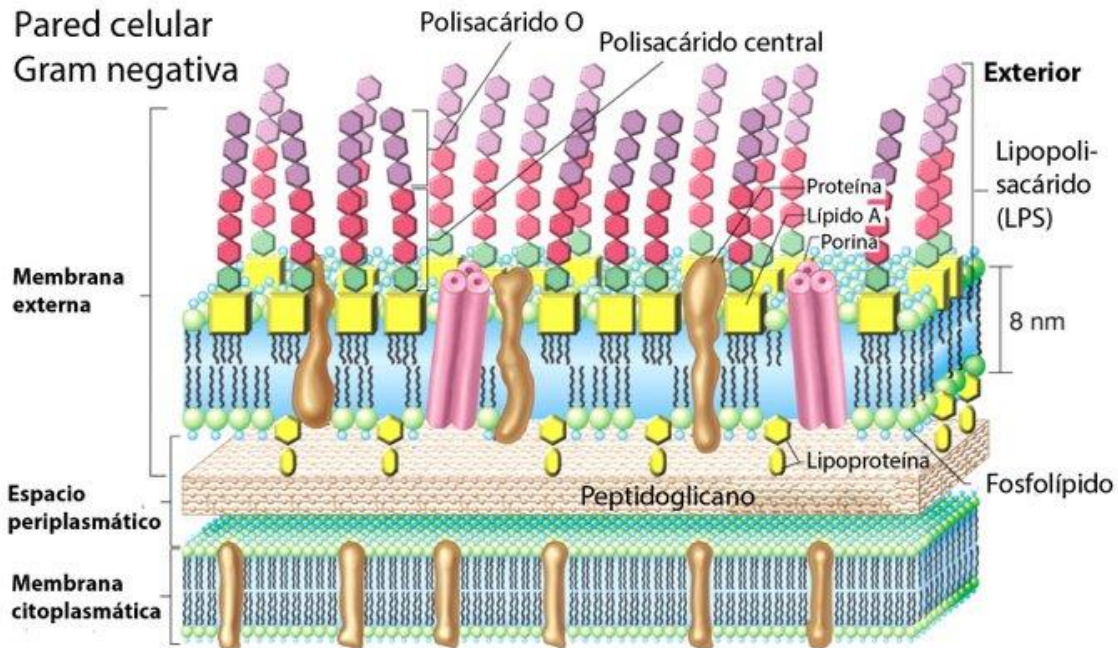


Figura 7. Pared celular de las bacterias gramnegativas. Tomado de SEM, 2016.

El grupo de las *E. coli* se divide en dos tipos: las intestinales y las extraintestinales. Las primeras están presentes en la microbiota intestinal del humano, de las cuales se han descrito seis patotipos, es decir, grupos con características, factores de virulencia y sintomatología clínica comunes asociados con infecciones intestinales: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), entero invasiva (EIEC), entero patógena (EPEC), entero agregativa (EAEC) y de adhesión difusa (DAPEC), causantes de infecciones relacionadas con diarreas, inflamación y vómito, entre otros síntomas (Manjarrez, 2012).

Existen otros tipos de *E. coli* extraintestinales (ExPEC) que ocasionan infecciones del tracto urinario; *Escherichia coli* uropatógenas (UPEC), y *E. coli* cervicovaginal (CVEC). Es la causa más común de infecciones en el tracto urinario, de bacteriemia y sepsis adquirida en la comunidad; es una de las causas de meningitis y sepsis neonatal que frecuentemente deja graves secuelas y puede llevar incluso a la muerte; también se ha aislado de infecciones intraabdominales y neumonía nosocomial, y ocasionalmente está implicada en otras infecciones como osteomielitis, celulitis e infecciones de heridas (Manjarrez, 2012; Soto, 2006).

Factores de virulencia

Las bacterias poseen mecanismos de patogenicidad que emergen al superar las defensas de un hospedero, a lo largo de la evolución han logrado adquirir características para invadir el ambiente del hospedero, expresar receptores superficiales especializados para su adhesión, permanecer ahí por procesos de colonización, evadir el sistema inmune para finalmente causar daño tisular y lograr tener acceso a fuentes de nutrientes necesarios para su crecimiento y reproducción (Cárdenas, 2014).

La patogenicidad de *E. coli* se debe a que posee diferentes factores de virulencia, que son moléculas específicas, principalmente proteínas producidas y liberadas en el hospedero. Estos factores están codificados por genes específicos ubicados en el cromosoma o elementos genéticos móviles, por ejemplo, plásmidos o transposones en patógenos bacterianos. Cada patotipo de *E. coli* tiene característicos mecanismos de patogenicidad y un perfil específico de factores de virulencia codificados por grupos de genes específicos, estos genes asociados a la patogenicidad pueden codificar actividades como adhesión, adquisición de hierro, actividad de toxinas, entre otras (Pakbin, 2021).

La mayoría de las bacterias para causar la enfermedad deben ingresar al organismo del hospedero por las puertas de entrada que son las mucosas, la piel y el depósito directo bajo la piel o las membranas, pero en el caso de los microorganismos que causan caries dental y acné, generan la enfermedad sin penetrar en el hospedero, se quedan en la periferia o superficie tisular (Cárdenas, 2014).

Adhesinas

La adherencia es el primer paso para la colonización y posterior infección del hospedero, este proceso es muy importante ya que, si no se adhieren, suelen ser eliminadas por secreciones mucosas y otros líquidos que bañan las superficies de los tejidos (Vignoli, 2017).

Las adhesinas son, por lo general, lectinas que son proteínas que tienen afinidad por los azúcares, que se adhieren de forma específica y complementaria a carbohidratos o residuos peptídicos de la superficie de las células eucariotas. La adherencia es un fenómeno altamente específico que requiere la participación tanto de las adhesinas bacterianas como de los receptores del hospedero. La mayoría de las bacterias expresan más de un tipo de adhesinas como por ejemplo los pili, las fimbrias y los flagelos, se les llama fimbriales por su estructura. También existen las adhesinas que no están en fimbrias, son denominadas afimbriales. (Cárdenas, 2014; Arias, 2009).

Cápsula

La cápsula es una red de polímeros que cubre toda la superficie bacteriana, la mayoría de las cápsulas están compuestas de polisacáridos y su papel es proteger a la bacteria de la respuesta inflamatoria del hospedero, esto es, activación del complemento y muerte mediada por fagocitosis (Cárdenas, 2014).

Sistema de adquisición de hierro

El hierro es un nutriente esencial para la vida de los seres vivos, participando en múltiples procesos metabólicos. Así forma parte de los grupos prostéticos de proteínas, interviene en el transporte de oxígeno, en la replicación del DNA y como par redox Fe^{2+}/Fe^{3+} en diversas reacciones que incluye la fosforilación oxidativa de la cadena respiratoria y reacciones de protección contra especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, la concentración de hierro libre en el cuerpo es relativamente baja y con el fin de obtenerlo, algunas bacterias secretan proteínas denominadas sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular que atrapan hierro con alta afinidad. Existen tres tipos principales: catecoles, hidroxamatos y un tercero que es la combinación de ambos (Vignoli 2017; Cárdenas, 2014).

Toxinas

Cuando captan concentraciones bajas de hierro y como alternativa a la adquisición de hierro mediante sideróforos, algunas bacterias producen toxinas. Las toxinas

causan muerte en células vecinas y liberan hierro, que entonces queda disponible accediendo el hierro que necesitan para nutrirse (Cárdenas, 2014).

Protectinas

Las protectinas son un conjunto de proteínas que ayudan a la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Ávalos, 2000).

Islas de patogenicidad

Las islas de patogenicidad (PAIs por sus siglas en inglés), son segmentos de DNA bacteriano que portan uno o más genes de virulencia, los cuales han sido adquiridos en bloque de una fuente externa. Genes para una amplia gama de determinantes de virulencia están asociados con PAIs, incluyendo los que codifican para ciertos mecanismos que le permiten resistir las defensas del hospedero, adhesinas, factores de colonización, adquisición de nutrientes, toxinas, entre otras (Fernández, 2004).

Genes de virulencia

E. coli tiene un gran número de genes de virulencia (Tabla 1) que codifican para adhesinas, sistemas de adquisición de hierro, citotoxinas, enterotoxinas, capsulares, protectinas, entre otros. (Momtaz *et al.*, 2013; Corbett y Roberts, 2008; Cárdenas, 2014; Pakbin, 2021; Ewers, 2007).

Tabla 1. Genes de virulencia de *Escherichia coli*.

Función	Gen	Nombre
Adhesinas	<i>pap</i>	Pilus asociado con pielonefritis
	<i>sfa</i>	Fimbria S
	<i>afal</i>	Adhesina afimbrial I
	<i>fim</i>	Fimbria tipo 1

	<i>focG</i>	Adhesina fimbrial
	<i>bmaE</i>	Aglutinina M
	<i>tsh</i>	Hemaglutínina temperatura sensible
	<i>iha</i>	Adhesina no hemaglutinante
Captación de hierro (sideróforos)	<i>iuc</i>	Aerobactina
	<i>iroN</i>	Proteína de membrana externa receptora de sideróforo
	<i>feoB</i>	Media la absorción de hierro férrico
	<i>fyuA</i>	Captación de yersinia férrica (receptor de yersiniabactina)
	<i>ireA</i>	Elemento sensible al hierro (supuesto receptor de sideróforo de catecolato)
	<i>irp2</i>	Proteína reprimible por hierro
Toxinas	<i>cnf1</i>	Factor citotóxico necrotizante 1
	<i>usp</i>	Proteína uropatogénica específica
	<i>hlyA</i>	Hemolisina A
	<i>vat</i>	Toxina autotransportadora vacuolizante
	<i>astA</i>	Toxina enteroagregativa termo estable
	<i>cva/cvi</i>	Genes del operón del plásmido colicina V
	<i>set1</i>	Enterotoxina 1 de Shigella
	<i>tsh</i>	Hemaglutinina sensible a la temperatura
	<i>sen</i>	Enterotoxina 2 de Shigella
Protectinas	<i>kpsMT</i>	Antígeno K
	<i>traT</i>	Proteína de transferencia
	<i>ompT</i>	Proteína de membrana externa T
	<i>iss</i>	Proteína que incrementa la sobrevivencia en suero
PAIs	<i>malX</i>	Marcador de isla asociado a patogenicidad

La investigación a nivel molecular de los distintos factores de virulencia es indispensable para conocer la patogenicidad de las enfermedades, que pueden contribuir a implementar estrategias preventivas contra las bacterias patógenas (Pakbin, 2021).

El análisis molecular de los distintos genes de virulencia en cepas de *E. coli* uropatógenas (UPEC) ha sido ampliamente estudiado (Paniagua, 2017), sin embargo, actualmente el papel de *E. coli* en la enfermedad periodontal aún es desconocido.

JUSTIFICACIÓN

El análisis molecular de las cepas periodontales de *E. coli* no ha sido estudiado en México, ni en ninguna otra parte del mundo, por lo que el presente trabajo contribuirá a determinar la expresión de los genes de virulencia en cepas periodontales de *E. coli* utilizando un modelo *in vitro* de infección en células epiteliales humanas.

ANTECEDENTES

- Medina en el 2010, realizó una revisión en Colombia sobre la alta prevalencia de sobreinfección por enterobacterias (las cuales podrían complicar el cuadro clínico de los pacientes y la respuesta a la terapia periodontal). Demostrando que el 10.2% de los pacientes diagnosticados con periodontitis refractaria presentaron enterobacterias, entre ellas *E. coli*, sin embargo, aún no se tiene conocimiento de estudios experimentales sobre la susceptibilidad y resistencia antibiótica a entéricos aislados de placa subgingival de pacientes con periodontitis crónica.
- En el año 2010, Pereyra y colaboradores realizaron un trabajo de investigación en 97 pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), en dichos pacientes la enfermedad periodontal es frecuente y de gran morbilidad. De los 97 pacientes, 58 presentaron enfermedad periodontal (59.7%) y 18 (31%) tenían enfermedad gingival. Los aislamientos bacterianos se realizaron en 16 pacientes (27.5%) predominando *E. coli*.
- Emamghorashi y colaboradores en el 2011 en Irán, estudiaron 96 cepas aisladas de *E. coli* de niños con infecciones urinarias agudas. Analizaron cuatro determinantes de urovirulencia mediante hibridación de colonias de DNA, incluidos los genes para fimbrias tipo 1 (*pil*), fimbrias P (*pap*), fimbrias S (*sfa*), hemolisinas (*hly*) y factor necrosante citotóxico 1 (*cnf1*). También determinaron los serotipos O. Obteniendo como resultados que el gen que codifica el factor de virulencia encontrado con mayor frecuencia en las cepas de *E. coli* estudiadas fue el gen de las fimbrias tipo 1 (27.4 %). La prevalencia de *pap*, *sfa*, *hly* y *cnf1* fue mayor en los serotipos que causan pielonefritis que en cistitis. El tipo de antígeno O más frecuente fue el O1 (12.2%). Hubo una correlación significativa entre el serotipo y el genotipo en *E. coli* uropatógena.
- López y colaboradores en México 2014 examinaron 108 cepas de *E. coli* de mujeres mexicanas, con diagnóstico clínico de infección del tracto urinario para identificar genes de virulencia, grupos filogenéticos y resistencia a los antibióticos. Se identificaron mediante PCR 16 genes de virulencia que codifican para adhesinas, toxinas, sideróforos, lipopolisacáridos (LPS) e

invasinas. La prevalencia de genes de virulencia fue *ecp* 98.1%, *fimH* 86.1%, *traT* 77.8%, *sfa/focDE* 74.1%, *papC* 62%, *iutA* 48.1%, *fyuA* 44.4%, *focG* 2.8%, *sfaS* 1.9%, *hlyA* 7.4%, *cnf1* 6.5%, *cdt-B* 0.9%, *cvaC* 2.8%, *ibeA* 2.8% y *rfa* 0.9%. Las cepas mostraron una alta presencia de sideróforos y genes de adhesión y una baja presencia de genes que codifican toxinas. La alta frecuencia del gen *papC* sugiere que estas cepas tienen la capacidad de colonizar riñones.

- Hernández en el 2017, en un estudio realizado en la FES Iztacala, determinó utilizando un modelo *in vitro* de infección de la línea celular vaginal A431 con cepas uropatógenas de *E. coli*, la expresión de genes que codifican para adhesinas (*fim*, *iha*), el gen del hierro (*irp*), diferentes genes de toxinas (*usp*, *astA*, *set-1*), el gen de adhesión (*fim*) y el antígeno capsular (*kpsMT*). Durante dicho modelo, se presentaron diferentes patrones de expresión, principalmente de genes necesarios para la adhesión, colonización, internalización y formación de biopelícula, evidenciando la patogenicidad de las cepas para provocar infecciones crónicas.
- Taboada, Cerón y Rodríguez en el año 2018, determinaron la frecuencia y distribución de la enfermedad periodontal asociada a la placa bacteriana en pacientes que acuden a atención estomatológica de la Clínica Universitaria de Atención a la Salud de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. Fue un estudio observacional, prolectivo, transversal y descriptivo en 73 pacientes, con un promedio de edad de 38.5 (± 9.6) años; 34% (25) del sexo masculino y 66% (48) del femenino. Se valoró placa dental bacteriana (PDB) con el índice de O'Leary y enfermedad periodontal con el índice periodontal de Russell. Concluyendo que la PDB tiene el papel más importante en la aparición de la enfermedad periodontal; sin embargo, no es el único elemento que interviene para su desarrollo, porque no todas las colonias formadoras de bacterias dentro de la cavidad oral son afines a los tejidos periodontales. Esta enfermedad está asociada a múltiples factores de riesgo biológicos, sistémicos y socioeconómicos, entre otros. Su combinación puede variar el curso y agresividad de la enfermedad.

- Hernández y colaboradores en el año 2022 realizaron un estudio con el objetivo de determinar la variabilidad en el genotipo de virulencia, el fenotipo de resistencia a antibióticos, la formación de biopelícula, filogrupos y serotipos en diferentes cepas periodontales de *Escherichia coli*, aisladas de pacientes con enfermedad periodontal y controles sanos. Aunque *E. coli* no se detectó en los controles (n=70), se aisló en el 14.7% (n=100) de los pacientes. La mayoría de las cepas fueron multirresistentes (n=81/100). Los genes de adhesión más frecuentes entre las cepas fueron *fimH* e *iha*, los genes de toxinas fueron *usp* y *hlyA*, los genes de adquisición de hierro fueron *fyuA* e *irp2*, y los genes de protectinas fueron *ompT* y *kpsMT*. Sugiriendo que *E. coli* puede estar involucrada en la enfermedad periodontal debido a su alta virulencia, resistencia a múltiples fármacos y una amplia distribución filogrupos y serotipos.

OBJETIVOS

General:

- Analizar la expresión de los genes de virulencia en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con enfermedad periodontal.

Particulares:

- Determinar la expresión de genes que codifican para adhesinas (*pap*, *papGI*, *papGII*, *papGIII*, *fim*, *afa*, *sfa*, *iha*, *focG* y *bmaE*),
- toxinas (*cnf1*, *hlyA*, *usp*, *set1*, *astA* y *tsh*),
- captación de hierro (*iuc*, *iroN*, *irp2*, *feoB*, *fyuA* e *ireA*),
- protectinas (*kpsMT*, *ompT*, *iss* y *traT*) e islas de patogenicidad (Pals; *malX*) en las cepas periodontales de *E. coli*.
- Establecer los patrones de expresión de los genes de virulencia de las cepas relacionados con el grado de enfermedad periodontal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Origen de las cepas

Para este estudio se trabajó con 100 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes diagnosticados con enfermedad periodontal que acudieron a la Clínica de Endoperiodontología de la FES Iztacala. Las cepas se encontraban almacenadas en medio BHI más glicerol y pertenecen al cepario del laboratorio de análisis clínicos de la CUSI Iztacala.

Resiembra de las cepas y extracción de DNA

A partir del medio de cultivo de BHI (infusión cerebro corazón; MCD Lab., México) más glicerol se tomó un inóculo por medio de un asa estéril de las cepas y del control por separado (*E. coli* ATCC 11775), 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; MCD Lab., México), y se incubaron 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 mm con 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 a 12,000 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 µl; 12 µl de Taq DNA polimerase 2x Master mix Red (AMPLIQON), 9 µL de agua libre de nucleasas, 1 µl de cada oligonucleótido (forward y reverse; 10 pmol) y 2 µL del DNA bacteriano. Las condiciones de PCR consistieron 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 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 de ampliación esperado fue de 919 pb.

Cultivo bacteriano para la extracción de RNAm

Para la extracción del RNAm de bacterias es fundamental promover la expresión de los genes de virulencia de interés, para lo cual las cepas de *E. coli* crecieron en 3 mL de caldo BHI (infusión cerebro corazón; MCD Lab., México), a 37° C durante 24 h en agitación constante. Al término, se realizaron diluciones 1:20 en caldo BHI estéril hasta obtener una $DO_{600\text{ nm}} = 0.4$, lo que indicó una concentración de 1×10^9 células. Las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 2000 rpm por 3 minutos, al término la pastilla fue resuspendida y lavada tres veces en 2 mL de Buffer Fosfato Salino (PBS), posteriormente se agitaron en un vortex por 10 segundos.

Posteriormente, 50 μL del cultivo bacteriano se depositaron sobre la superficie de la línea celular de pulmón A549, previamente preparada en la Unidad de Biomedicina (UBIMED) de las FES Iztacala. Las placas con la línea celular infectada se incubaron a 37°C por 48 h en 5% de CO_2 . Al término de este tiempo, se recolectaron 300 μL de las células bacterianas de la superficie de cada uno de los pozos de la línea celular, se depositaron en tubos Eppendorf estériles con 500 μL de PBS. Posteriormente se resuspendieron con un vortex por 10 s, se centrifugaron a 8000 rpm por 5 minutos, se desechó el sobrenadante conservando únicamente la pastilla.

Extracción del RNA bacteriano

Para la extracción del RNA bacteriano se utilizó el equipo QIAcube (Qiagen®), alimentado con los siguientes amortiguadores incluidos en el RNeasy mini kit (Qiagen®):

- Frasco con 220 mL de RLT (amortiguador de pH de lisis que contiene tiocianato de guanidina).
- Frasco con 220 mL de RW1 (amortiguador de pH de lavado conformado por etanol y una pequeña cantidad de tiocianato de guanidina).
- Frasco con 55 mL de RPE concentrado (amortiguador de pH de lavado, antes de usar adicionar cuatro volúmenes de etano al 96%)
- Frasco con 50 mL de agua libre de RNAsas.

En el QIAcube se colocaron los frascos de 25 mL de amortiguador de pH RLT (contenía 10 μ L de β -mercaptoethanol (β -ME) por cada ml de RLT), RW1, RPE, H₂O libre de RNAsas y etanol al 96%. Para la preparación del amortiguador de pH de lisis celular TE (Tris-HCl, EDTA) se preparó una solución con 10 mM Tris-HCl y 1 mM de EDTA, el pH se ajustó a 8.0 con ayuda de NaOH, por último, se adicionó 1 mg/mL de lisozima (Paniagua *et al*, 2016).

Los tubos Eppendorf (exclusivamente los incluidos en el kit RNeasy) con las pastillas celulares obtenidas se depositaron en los pozos del agitador del QIAcube, el cual puede extraer RNA de bacterias de 12 muestras por corrida. Terminada la corrida, se midió la concentración del RNA en el espectrofotómetro Nanodrop 2000. El RNA es muy inestable por lo que inmediatamente se realizó la reversotranscripción a DNAc.

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 ADN genómico. Para un volumen final por mezcla de reacción de 14 μ L se agregaron cada uno de los siguientes componentes: 2 μ L de gDNA Wipeout buffer 7x, 5 μ L de ARN templado y 7 μ L de agua libre de RNasa. Posteriormente se incubaron los tubos a 42°C por 2 minutos, e inmediatamente se depositarán 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

complementaria de DNAc. Para un volumen final de 20 μL se utilizaron los siguientes componentes: 1 μL de master mix Quantiscript Reverse Transcriptasa, 4 μL de Quantiscript RT buffer, 5x (Mg^{2+} y dNTPs), 1 μL de primer mix y los 14 μL de ARN templado de la reacción anterior. 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 la PCR en Tiempo Real (Paniagua *et al*, 2011).

Expresión de los marcadores de virulencia por PCR en Tiempo Real

Los oligonucleótidos utilizados para la expresión de los diferentes genes de virulencia son los descritos por Momtaz *et al.*, (2013). Para determinar la expresión de los diferentes genes de virulencia se utilizó el equipo de PCR en Tiempo Real Corbette® (Rotor-Gene 6000). El volumen final por mezcla de reacción fue de 25 μL : 12.5 μL de 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 DNAc templado (100 ng/ μL). Las condiciones de amplificación para los genes *pap*, *papGI*, *papGII*, *iha*, *bmaE*, *usp*, *astA*, *irp2*, *feoB*, *fyuA*, *kpsMT* y *traT* fueron: un ciclo de activación de la Hot Start a 95°C durante 2 minutos y 40 ciclos de amplificación, que se inició con la desnaturalización a 95°C por 5 segundos y finalmente alineación y extensión combinados a 60°C por 10 segundos. Mientras que las condiciones para los genes *papGIII*, *fim*, *afa*, *sfa*, *focG*, *cnf1*, *hlyA*, *set1*, *tsh*, *iuc*, *iroN*, *ireA*, *ompT*, *iss* y *malX* fueron: un ciclo de activación de la Hot Start a 95°C durante 3 minutos y 40 ciclos de amplificación, que se inició con la desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 57°C por 30 segundos y finalmente extensión a 72°C por 20 segundos. Los controles internos (House keeping) para cada ensayo fueron los genes *arcA* (Proteína de control de la respiración anaeróbica) y *rpo* (RNA polimerasa sigma). La melting point se realizó en cada corrida de PCR en Tiempo Real. La cepa de *E coli* ATCC 25922 se utilizó

como control positivo en cada ensayo. Como control negativo se incluyó un NTC (no control templado).

RESULTADOS

Pacientes estudiados

Se analizaron 100 cepas de *E. coli* previamente aisladas de pacientes diagnosticados con alguna enfermedad periodontal. De las 100 cepas se encontró que el 58% (n=58) de los pacientes fueron del sexo femenino y el 42% (n=42) masculino (Fig. 8). En cuanto al rango de edad, en el caso de las mujeres se notó más frecuencia entre los 44 a los 57 años (Fig. 9) y para los hombres la frecuencia fue de los 52 a los 66 años (Fig. 10).

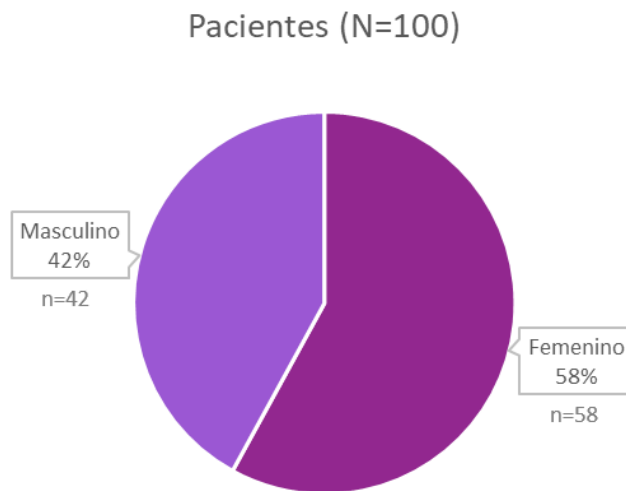


Figura 8. Sexo de los pacientes estudiados (n=100).

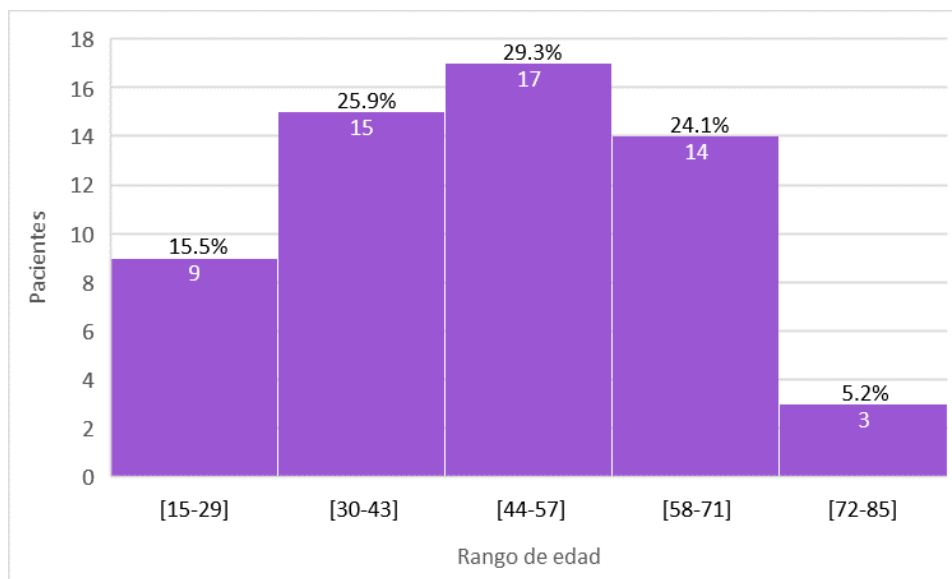


Figura 9. Frecuencia por rango de edad en mujeres (n=58).

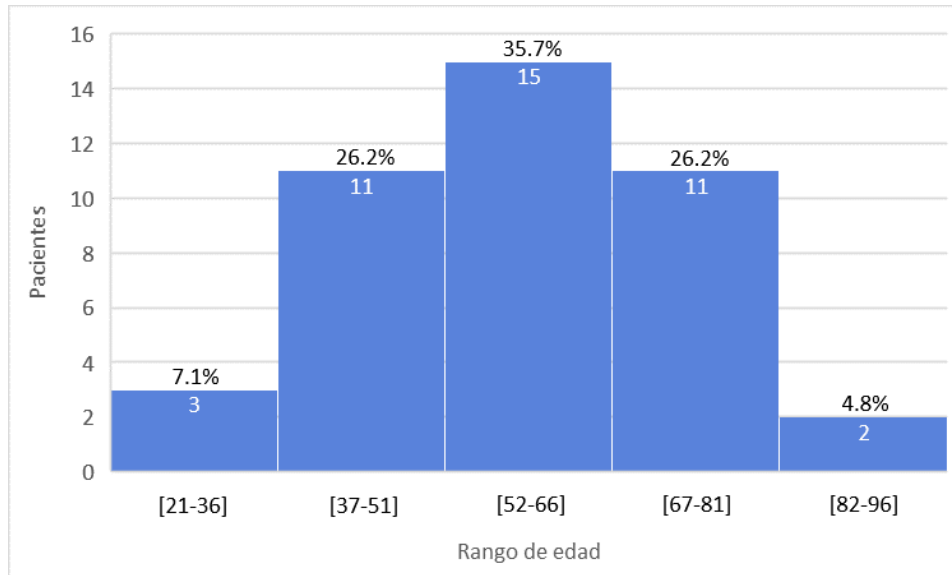


Figura 10. Frecuencia por rango de edad en hombres (n=42).

De los 100 pacientes estudiados, el 59% fue diagnosticado con periodontitis moderada, el 29% con periodontitis crónica y el 12% con gingivitis (Fig. 11).

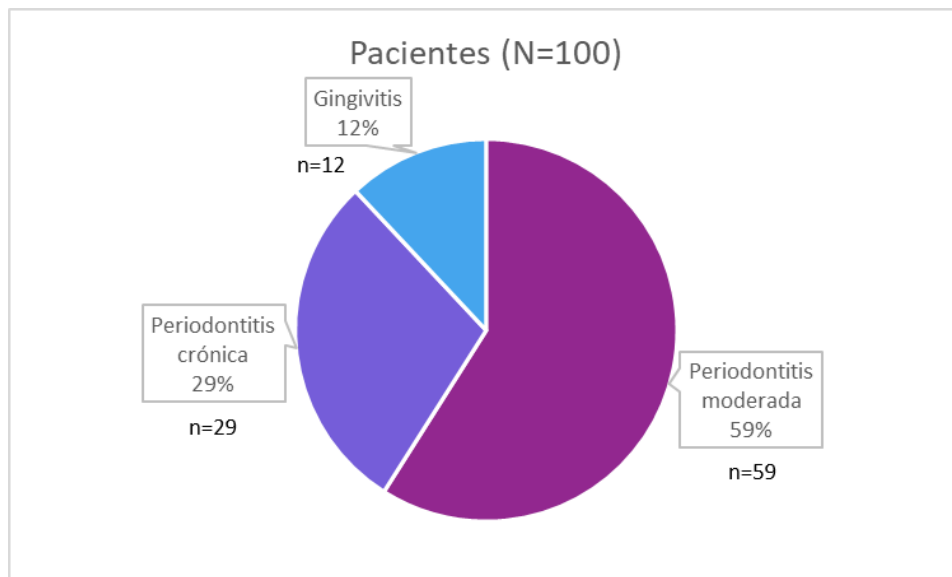


Figura 11. Diagnóstico de los pacientes estudiados (n=100).

Detección de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli*

La identificación molecular de las cepas analizadas de *E. coli* por PCR de punto final (Fig. 12) se realizó mediante la amplificación del gen 16S rRNA utilizando los oligonucleótidos wl-3110 (AGAGTTTGATCMTGGCTCAG) y wl-3111 (CCGTCAATTCATTGAGTT) (Lane *et al.*, 1985).

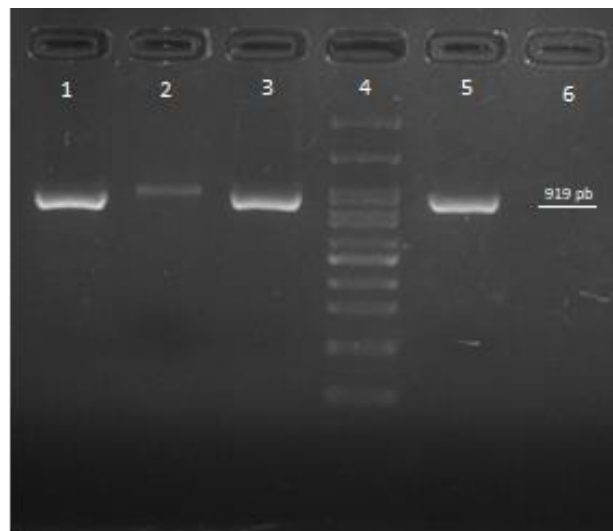


Figura 12. Detección de *E. coli* por PCR punto final (919 pb). En el carril 1 se muestra el control positivo (*E. coli* ATCC 11775), en los carriles 2, 3 y 5 cepas de *E. coli*, en el carril 4 el marcador de peso molecular (100 pb) y en el carril 6 el control negativo sin DNA molde.

Expresión de los genes de virulencia en las cepas de *E. coli*

La expresión de los genes de virulencia de las cepas estudiadas se realizó mediante PCR en tiempo real. En la Tabla 2 y Figuras 13-34 se aprecia la expresión global de los diferentes genes de virulencia en las cepas de *E. coli* después de la infección *in vitro* de la línea celular epitelial humana A549. Los genes de adhesión expresados con mayor frecuencia fueron *fim* e *iha*, de toxinas fue *usp*, de adquisición de hierro fueron *feoB*, *fyuA* e *irp2*, y de protectinas *traT*, *kpsMT* y *ompT*. Observando que el mayor número de cepas positivas y porcentaje de expresión los obtuvieron los sistemas de adquisición de hierro.

Tabla 2. Genes estudiados con su función, número de cepas positivas y porcentaje de expresión (n=100).

Función	Gen	No. cepas positivas	% de expresión
Adhesión	<i>fim</i>	48	48%
	<i>iha</i>	37	37%
	<i>pap</i>	18	18%
	<i>sfa</i>	10	10%
	<i>papGII</i>	6	6%
	<i>afa</i>	5	5%
	<i>papGIII</i>	1	1%
	<i>papGI</i>	0	0%
	<i>focG</i>	0	0%
	<i>bmaE</i>	0	0%
Toxinas	<i>usp</i>	33	33%
	<i>hlyA</i>	10	10%
	<i>set1</i>	7	7%
	<i>astA</i>	7	7%
	<i>cnf1</i>	6	6%
	<i>tsh</i>	0	0%
Adquisición de hierro (Sideróforos)	<i>feoB</i>	84	84%
	<i>fyuA</i>	62	62%
	<i>irp2</i>	61	61%
	<i>iroN</i>	35	35%
	<i>ireA</i>	9	9%
	<i>iuc</i>	0	0%
Protectinas	<i>traT</i>	50	50%
	<i>kpsMT</i>	35	35%
	<i>ompT</i>	28	28%
	<i>iss</i>	4	4%
PAIs	<i>malX</i>	45	45%

Con respecto a la expresión de las cepas aisladas de pacientes con gingivitis (Tabla 3) se observa que la expresión más elevada de los genes de virulencia fueron *fim* e *iha* en el caso de la adhesión, de adquisición de hierro fueron *feoB*, *fyuA* e *irp2* y de protectinas *traT* y *kpsMT*.

Tabla 3. Expresión de genes de virulencia relacionados con la gingivitis (n=12).

Función	Gen	No. cepas positivas	% de expresión
Adhesión	<i>fim</i>	8	66.7
	<i>iha</i>	7	58.3
	<i>afa</i>	3	25
	<i>pap</i>	2	16.7
	<i>sfa</i>	2	16.7
	<i>papGII</i>	0	0
	<i>papGIII</i>	0	0
	<i>papGI</i>	0	0
	<i>focG</i>	0	0
	<i>bmaE</i>	0	0
Toxinas	<i>usp</i>	3	25
	<i>hlyA</i>	3	25
	<i>astA</i>	2	16.7
	<i>set1</i>	1	8.3
	<i>cnf1</i>	1	8.3
	<i>tsh</i>	0	0
Adquisición de hierro (Sideróforos)	<i>feoB</i>	11	91.7
	<i>fyuA</i>	9	75
	<i>irp2</i>	9	75
	<i>iroN</i>	3	25
	<i>ireA</i>	2	16.7
	<i>iuc</i>	0	0

Protectinas	<i>traT</i>	9	75
	<i>kpsMT</i>	7	58.3
	<i>ompT</i>	4	33.3
	<i>iss</i>	0	0
PAIs	<i>malX</i>	4	33.3

En el caso de las cepas aisladas de pacientes con periodontitis moderada (Tabla 4) se observa que la expresión más elevada de genes de virulencia fueron los que codifican para adhesión únicamente el gen *fim*, de adquisición de hierro *feoB*, *fyuA* e *irp2*, de protectinas solo el gen *traT* y de las islas de patogenicidad el gen *malX*.

Tabla 4. Expresión de genes de virulencia relacionados con la periodontitis moderada (n=59).

Función	Gen	No. cepas positivas	% de expresión
Adhesión	<i>fim</i>	26	44.1
	<i>iha</i>	20	34
	<i>pap</i>	10	16.9
	<i>sfa</i>	5	8.5
	<i>papGII</i>	3	5.1
	<i>papGIII</i>	1	1.7
	<i>afa</i>	0	0
	<i>papGI</i>	0	0
	<i>focG</i>	0	0
	<i>bmaE</i>	0	0
Toxinas	<i>usp</i>	21	35.6
	<i>set1</i>	4	6.8
	<i>cnf1</i>	4	6.8
	<i>astA</i>	3	5.1

	<i>hlyA</i>	2	3.4
	<i>tsh</i>	0	0
Adquisición de hierro (Sideróforos)	<i>feoB</i>	48	81.4
	<i>fyuA</i>	37	62.7
	<i>irp2</i>	34	57.6
	<i>iroN</i>	23	39
	<i>ireA</i>	6	10.2
	<i>iuc</i>	0	0
Protectinas	<i>traT</i>	27	45.8
	<i>kpsMT</i>	19	32.2
	<i>ompT</i>	16	27.1
	<i>iss</i>	4	6.8
PAIs	<i>malX</i>	29	49.2

Con respecto a la expresión de las cepas aisladas de pacientes con periodontitis crónica (Tabla 5) y al igual que en las cepas aisladas de pacientes con periodontitis moderada (Tabla 4) la expresión más elevada de genes de virulencia fueron los que codifican para adhesión únicamente el gen *fim*, de adquisición de hierro *feoB*, *irp2* y *fyuA*, de protectinas solo el gen *traT* y de las islas de patogenicidad el gen *malX*.

Tabla 5. Expresión de genes de virulencia relacionados con la periodontitis crónica (n=29).

Función	Gen	No. cepas positivas	% de expresión
Adhesión	<i>fim</i>	14	48.3
	<i>iha</i>	10	34.5
	<i>pap</i>	6	20.7
	<i>sfa</i>	3	10.3
	<i>papGII</i>	3	10.3

	<i>afa</i>	2	6.9
	<i>papGIII</i>	0	0
	<i>papGI</i>	0	0
	<i>focG</i>	0	0
	<i>bmaE</i>	0	0
Toxinas	<i>usp</i>	9	31
	<i>hlyA</i>	5	17.2
	<i>set1</i>	2	6.9
	<i>astA</i>	2	6.9
	<i>cnf1</i>	1	3.5
	<i>tsh</i>	0	0
Adquisición de hierro (Sideróforos)	<i>feoB</i>	25	86.2
	<i>irp2</i>	18	62.1
	<i>fyuA</i>	16	55.2
	<i>iroN</i>	9	31
	<i>ireA</i>	1	3.5
	<i>iuc</i>	0	0
Protectinas	<i>traT</i>	14	48.3
	<i>kpsMT</i>	9	31
	<i>ompT</i>	8	27.6
	<i>iss</i>	0	0
PAIs	<i>malX</i>	12	41.4

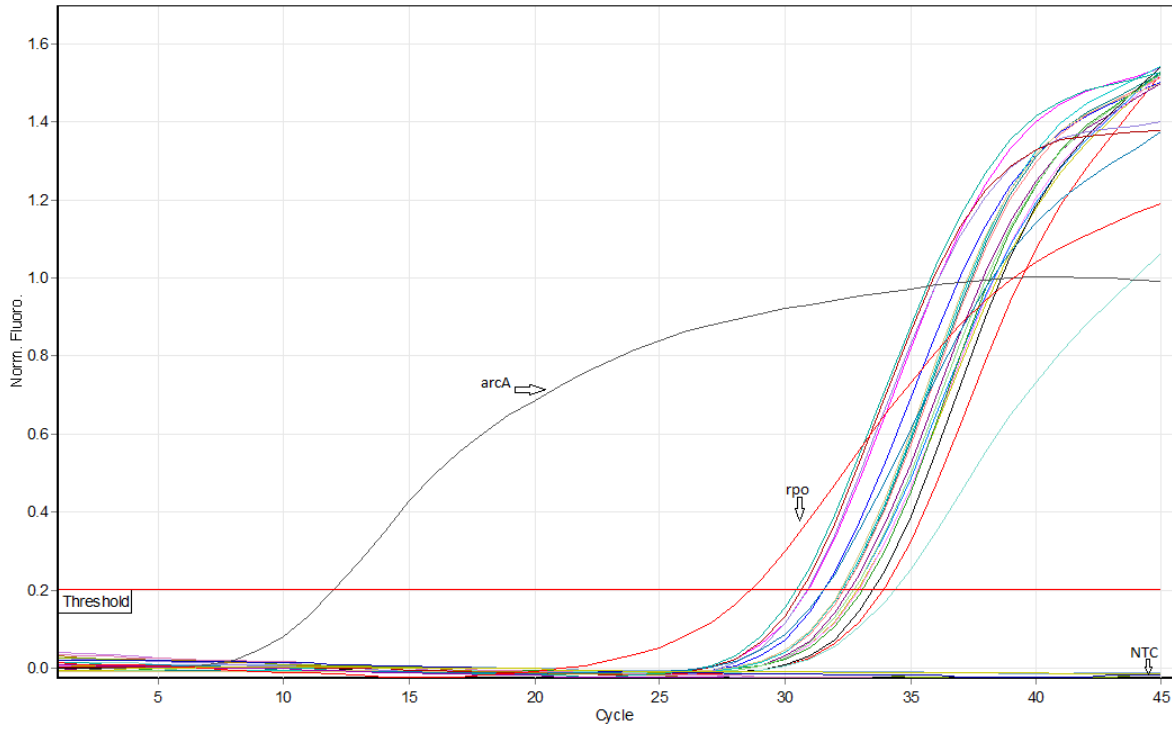


Figura 13. Expresión de los genes *pap* y *papGII* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

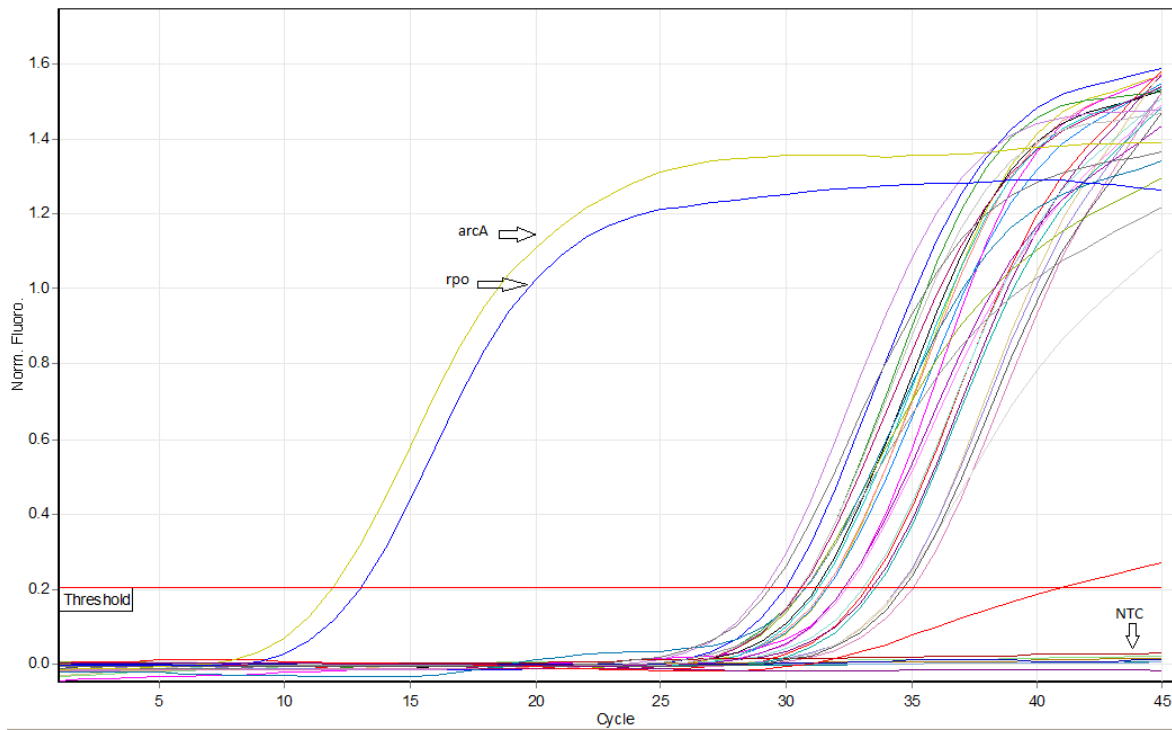


Figura 14. Expresión del gen *fim* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

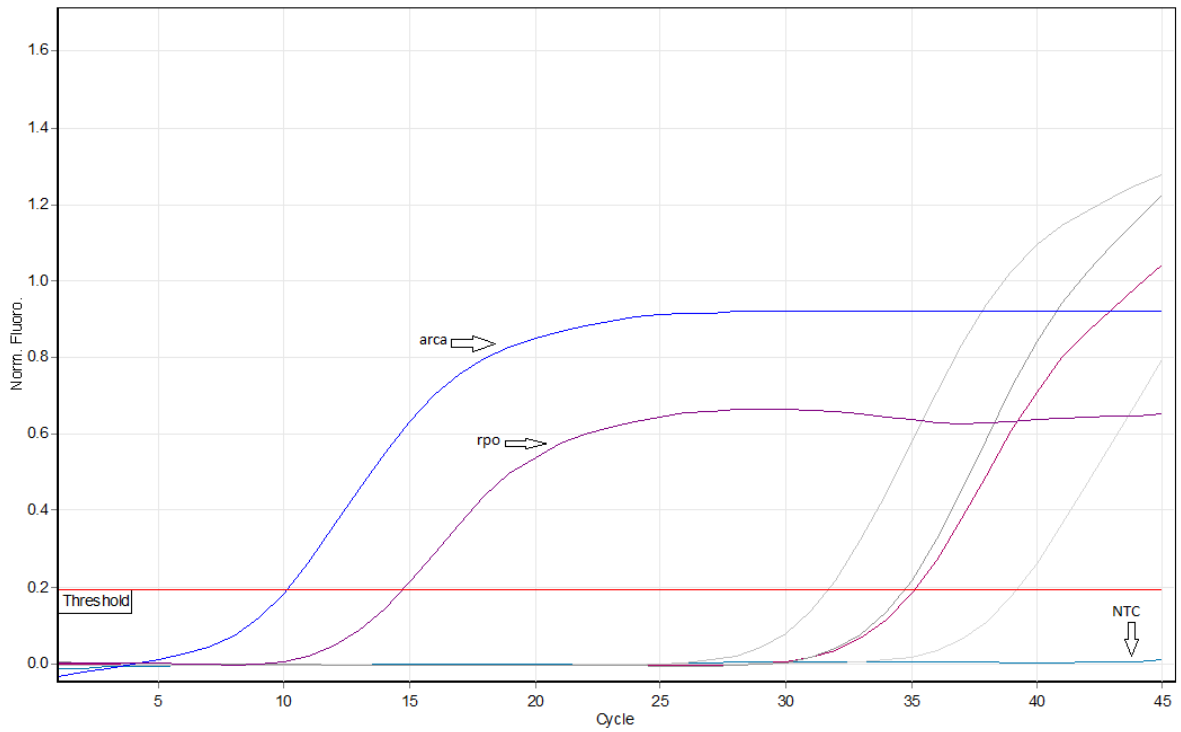


Figura 15. Expresión del gen *afa* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

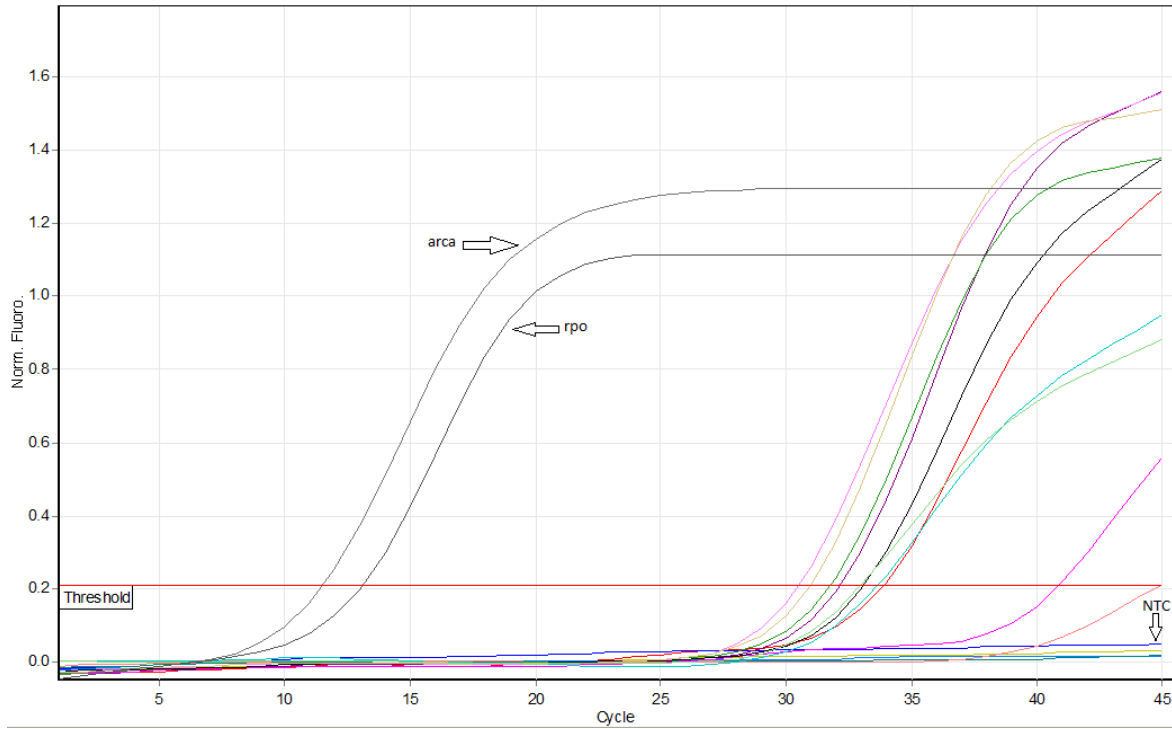


Figura 16. Expresión del gen *sfa* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

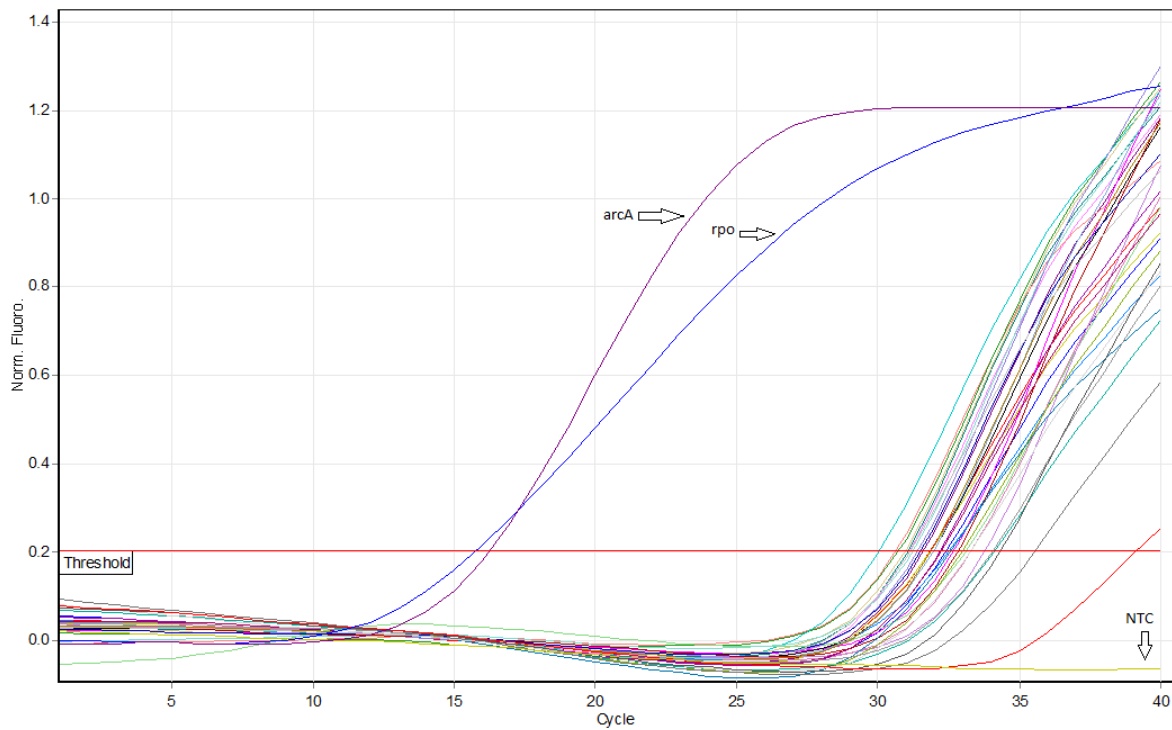


Figura 17. Expresión del gen *iha* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

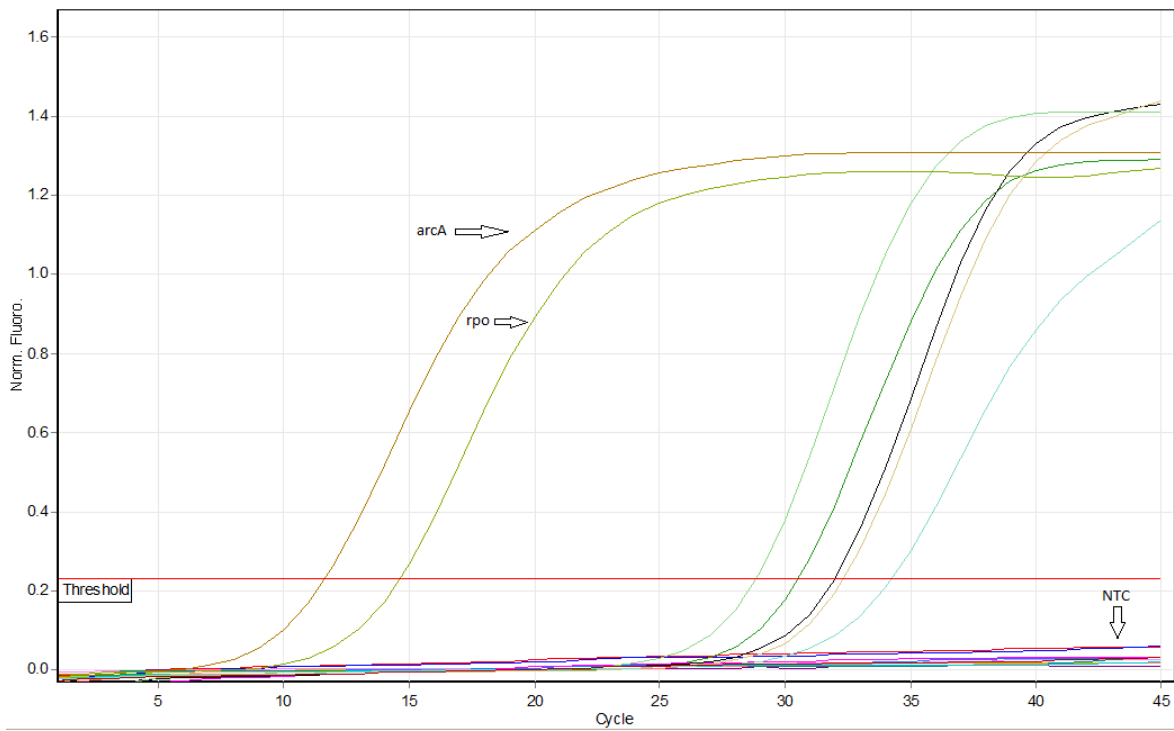


Figura 18. Expresión del gen *cnf1* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

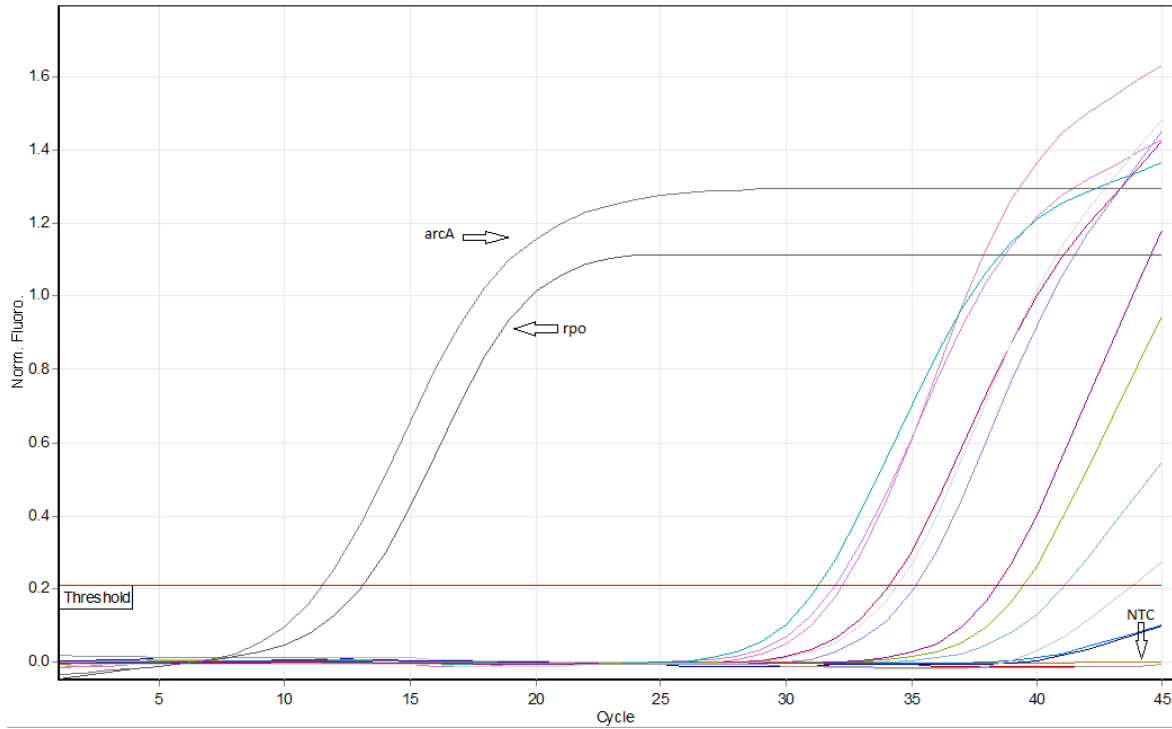


Figura 19. Expresión del gen *hlyA* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

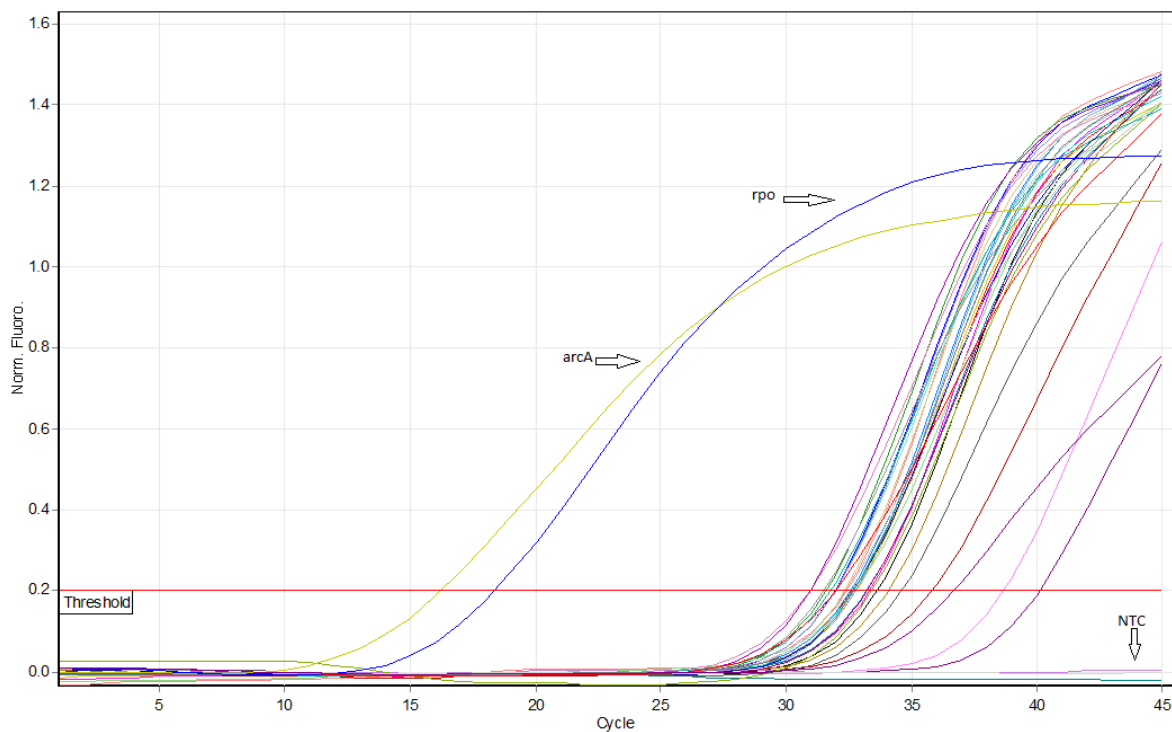


Figura 20. Expresión del gen *usp* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

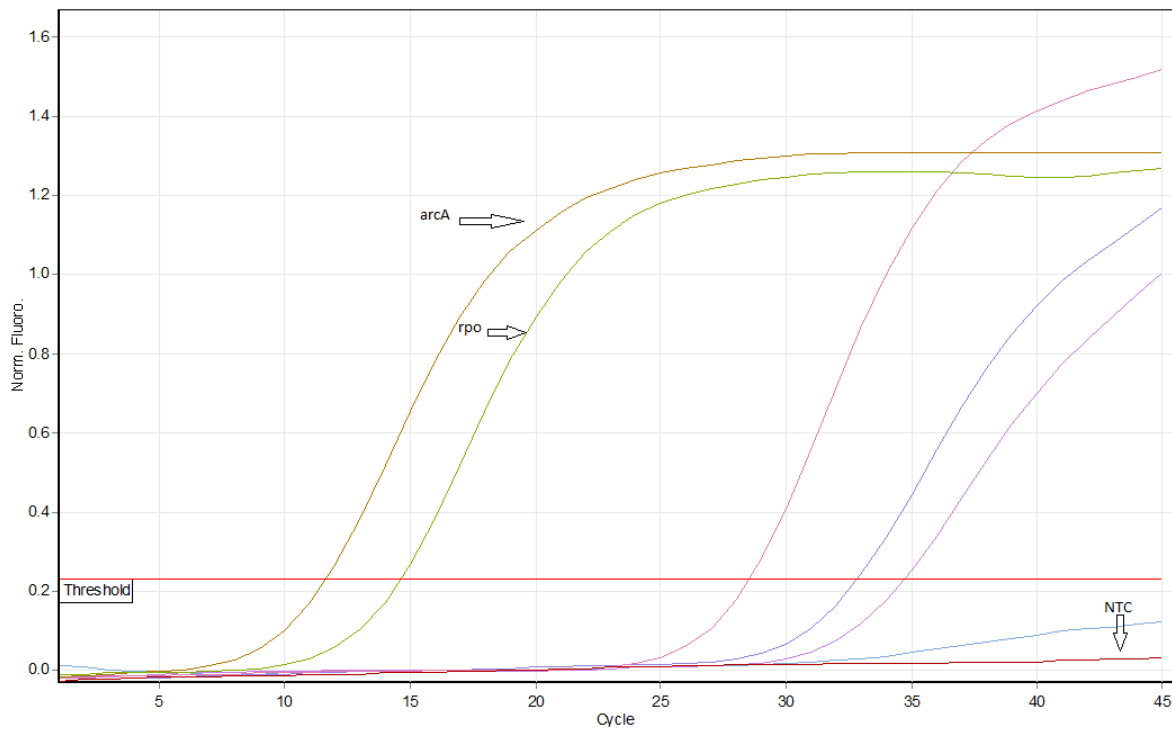


Figura 21. Expresión del gen *set1* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

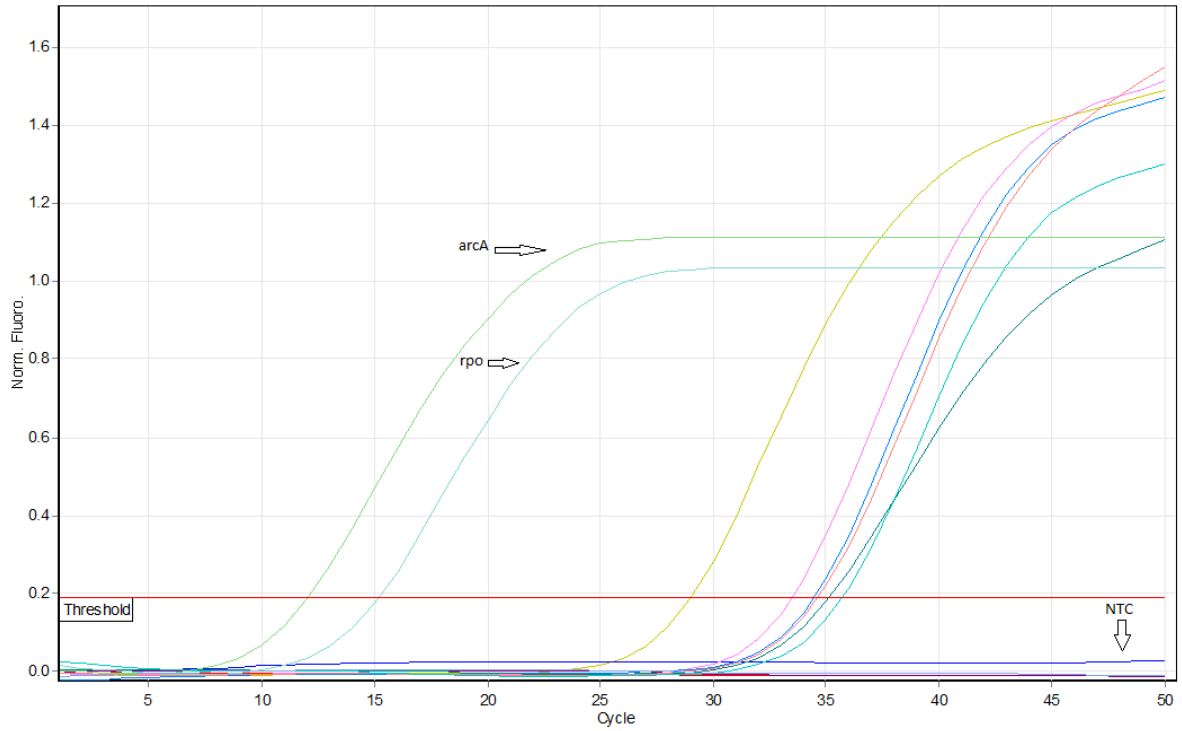


Figura 22. Expresión del gen *astA* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

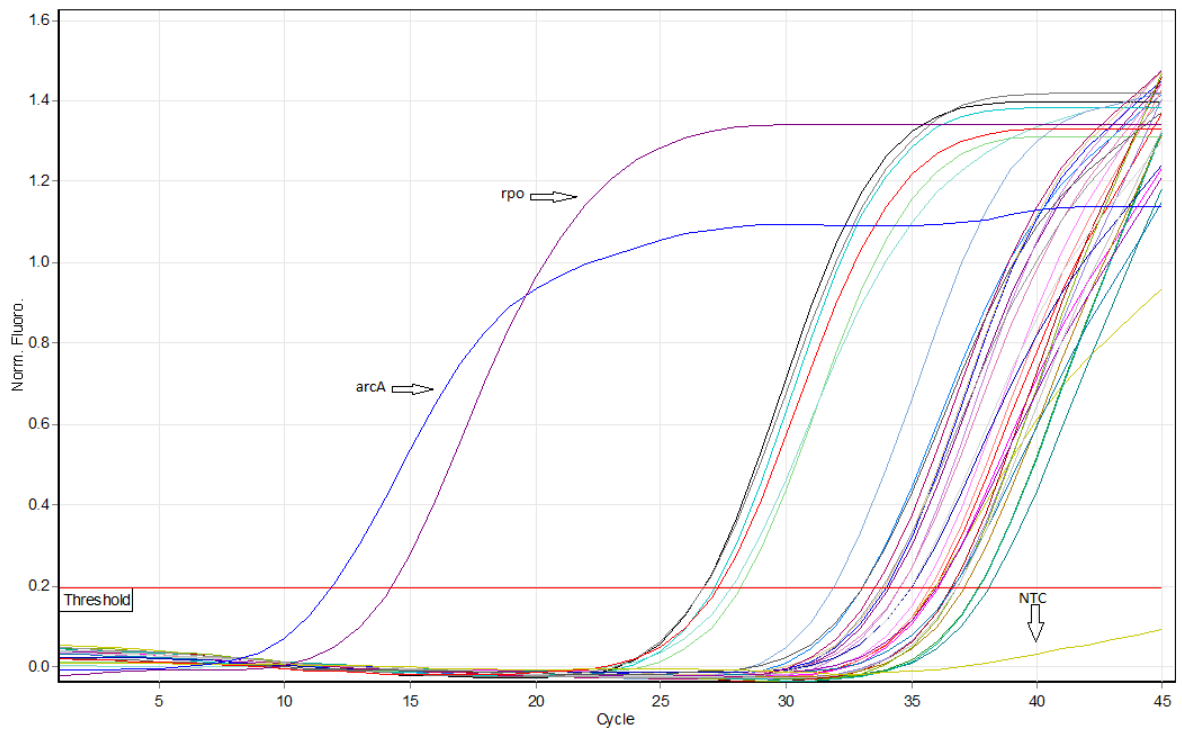


Figura 23. Expresión del gen *iroN* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

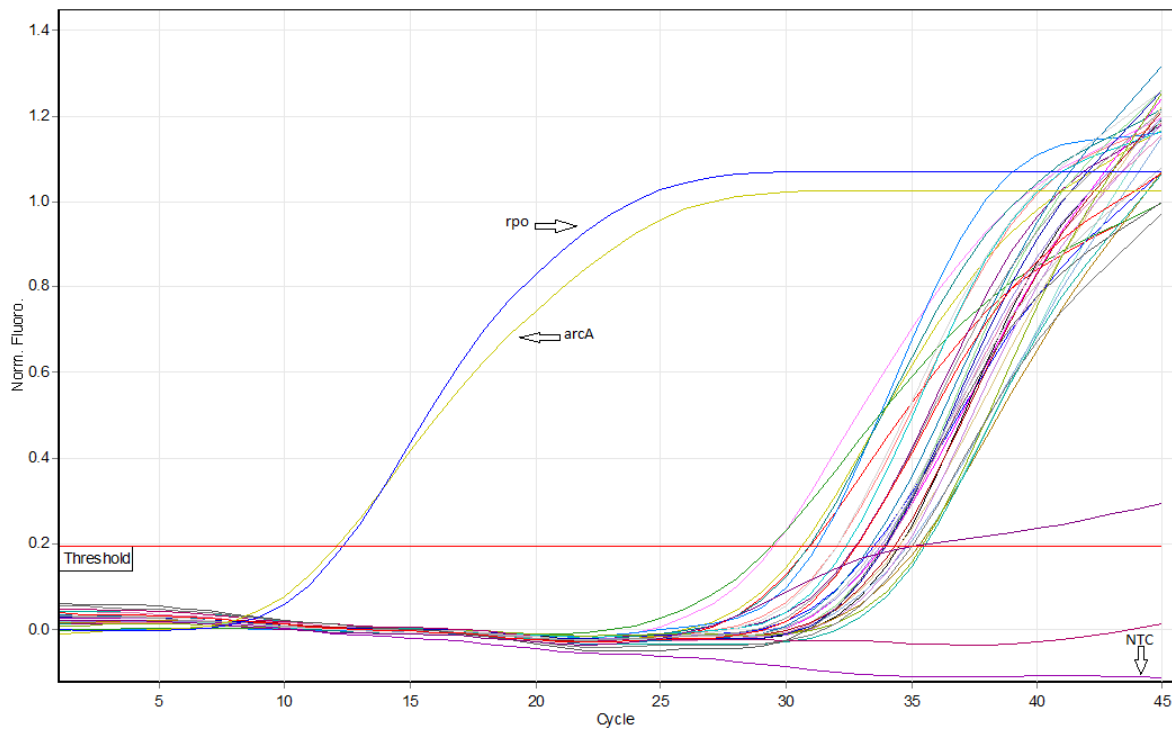


Figura 24. Expresión del gen *irp2* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

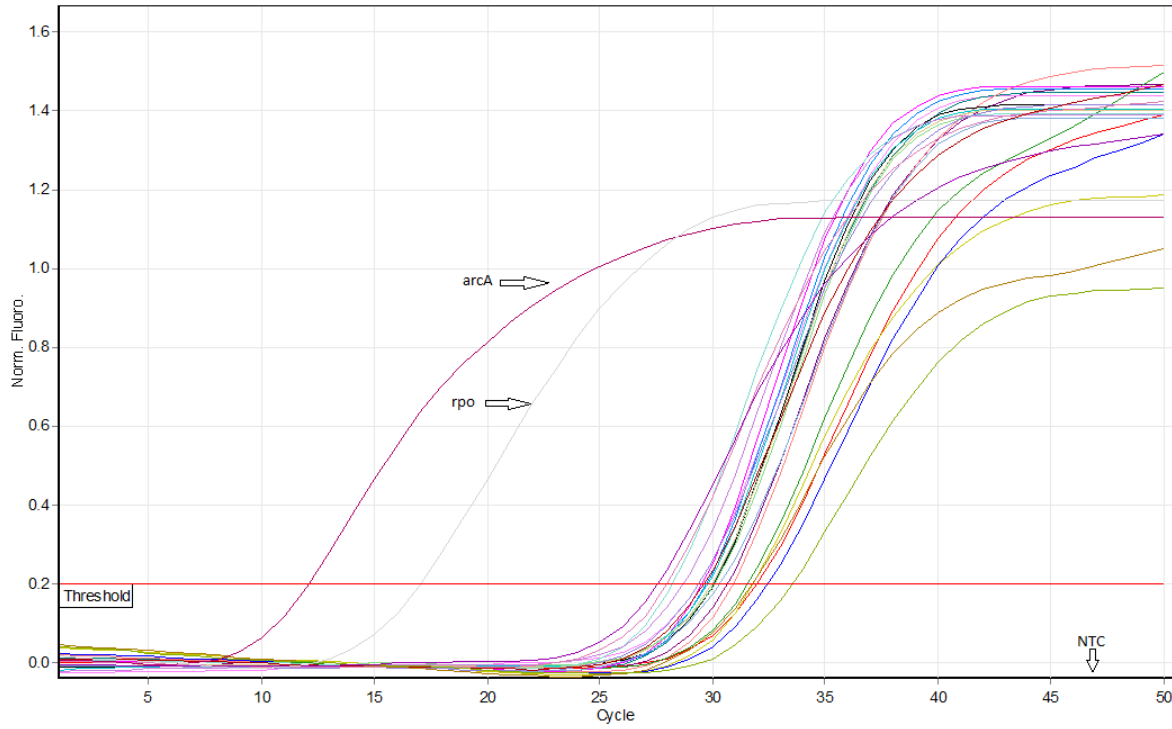


Figura 25. Expresión del gen *feoB* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

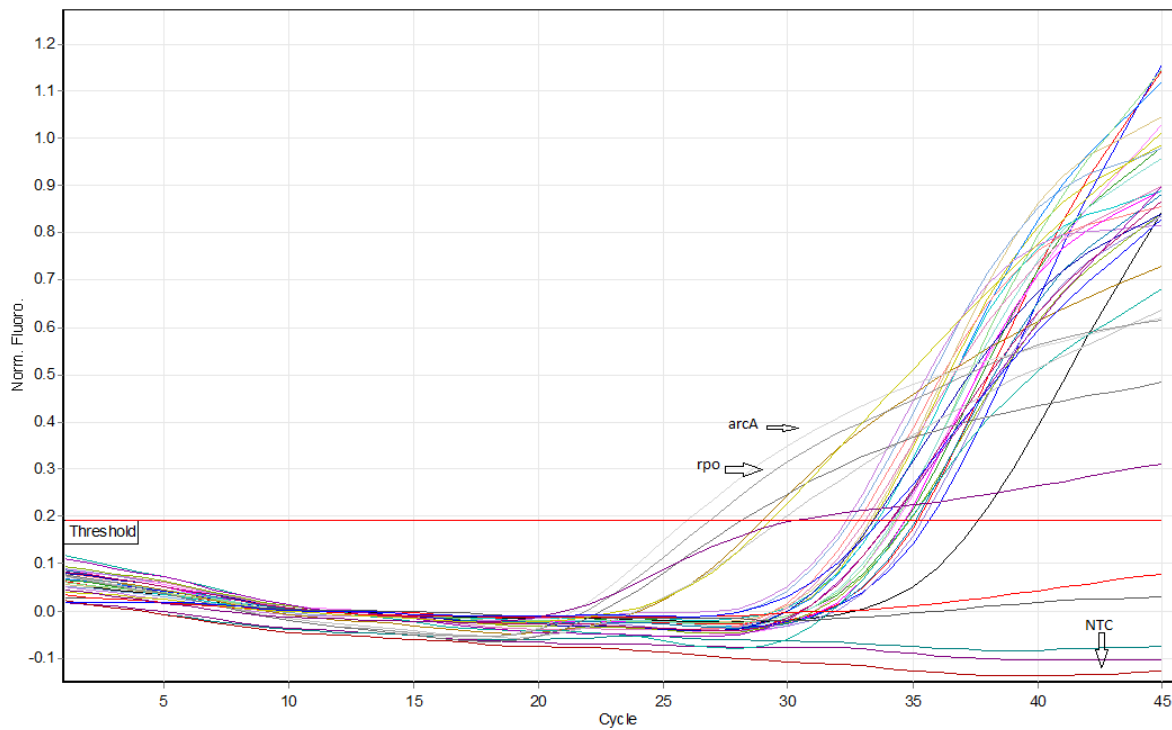


Figura 26. Expresión del gen *fyuA* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

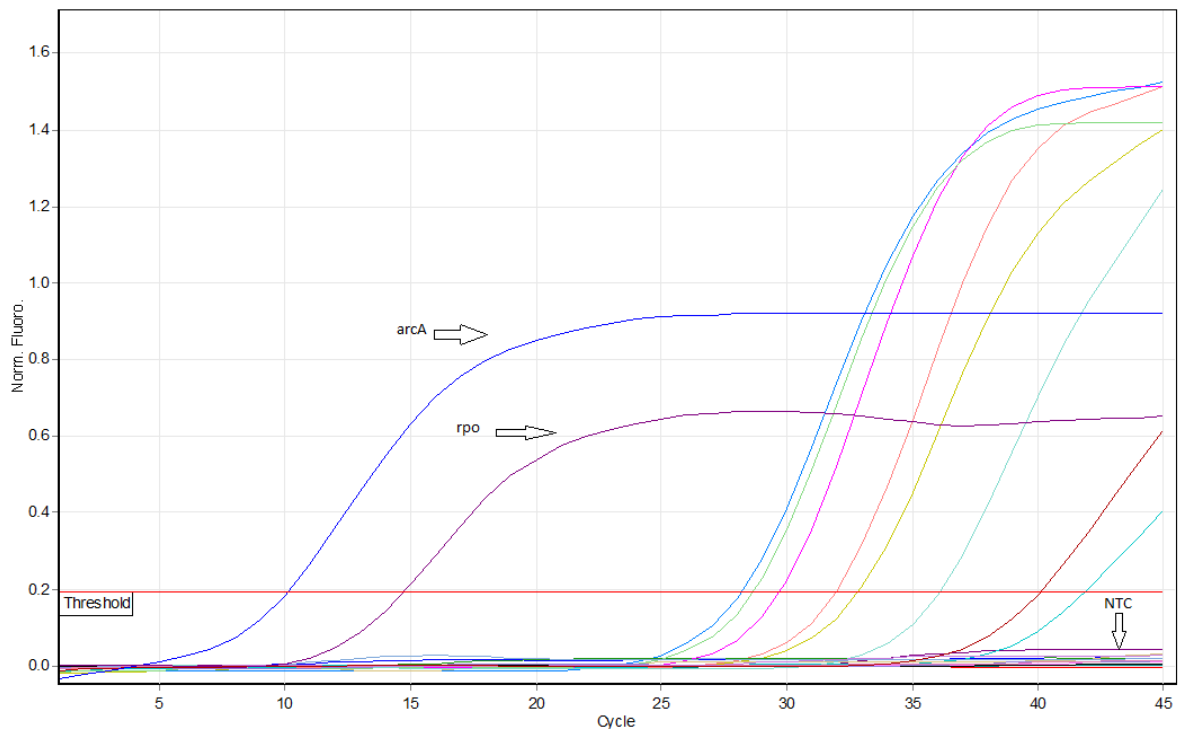


Figura 27. Expresión del gen *ireA* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

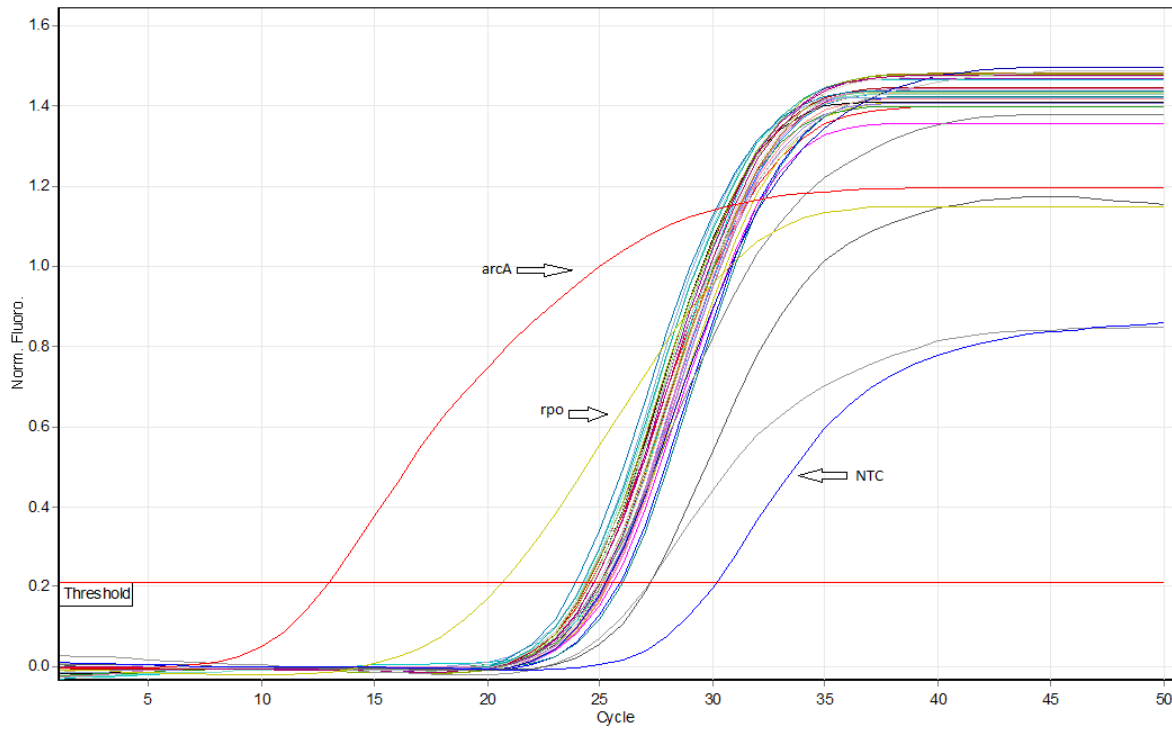


Figura 28. Expresión del gen *kpsMT* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

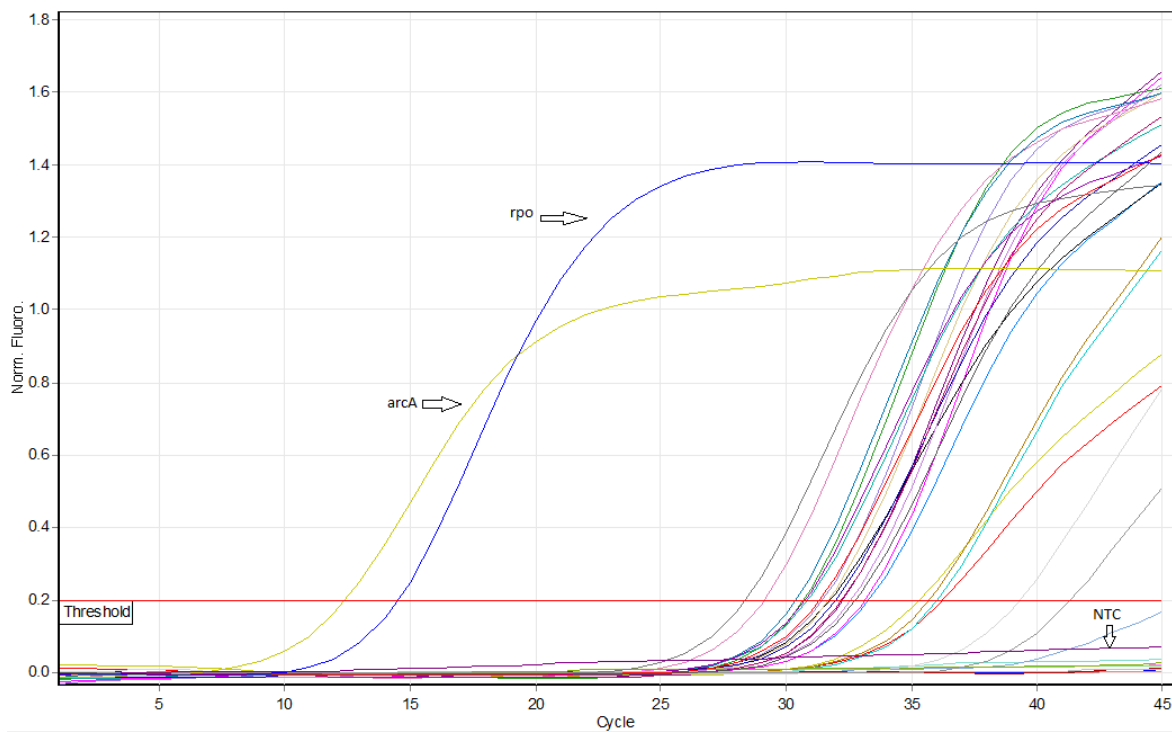


Figura 29. Expresión del gen *ompT* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

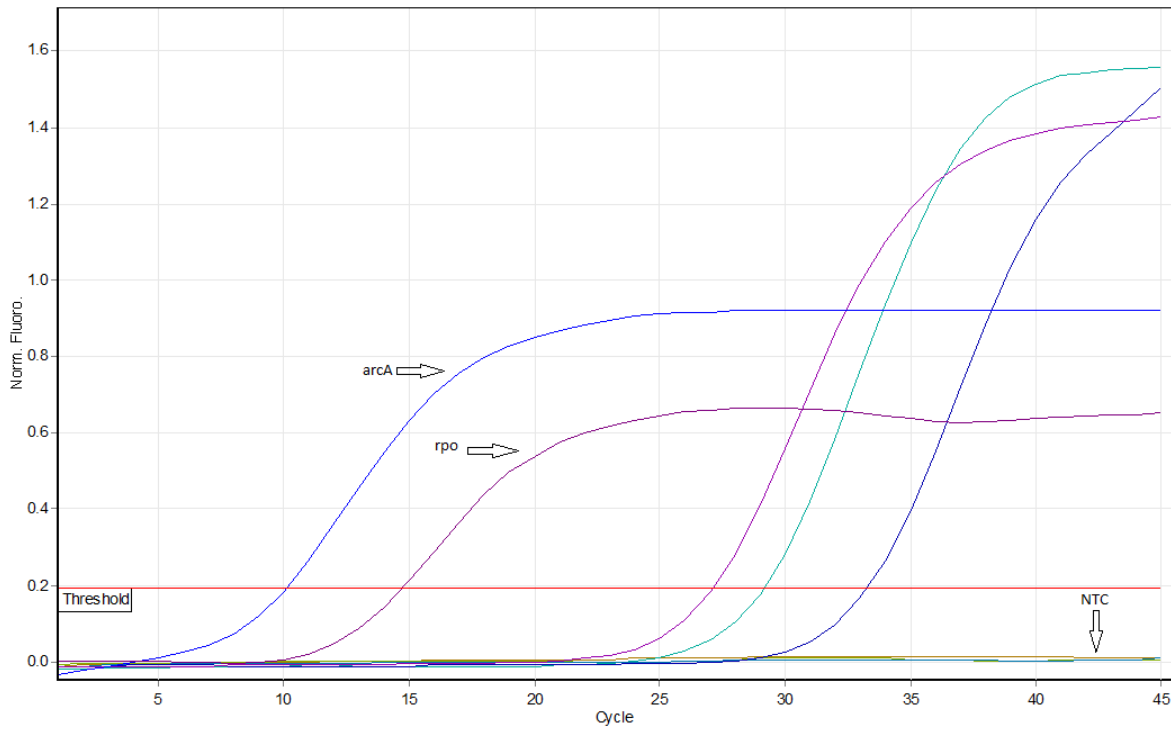


Figura 30. Expresión del gen *iss* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

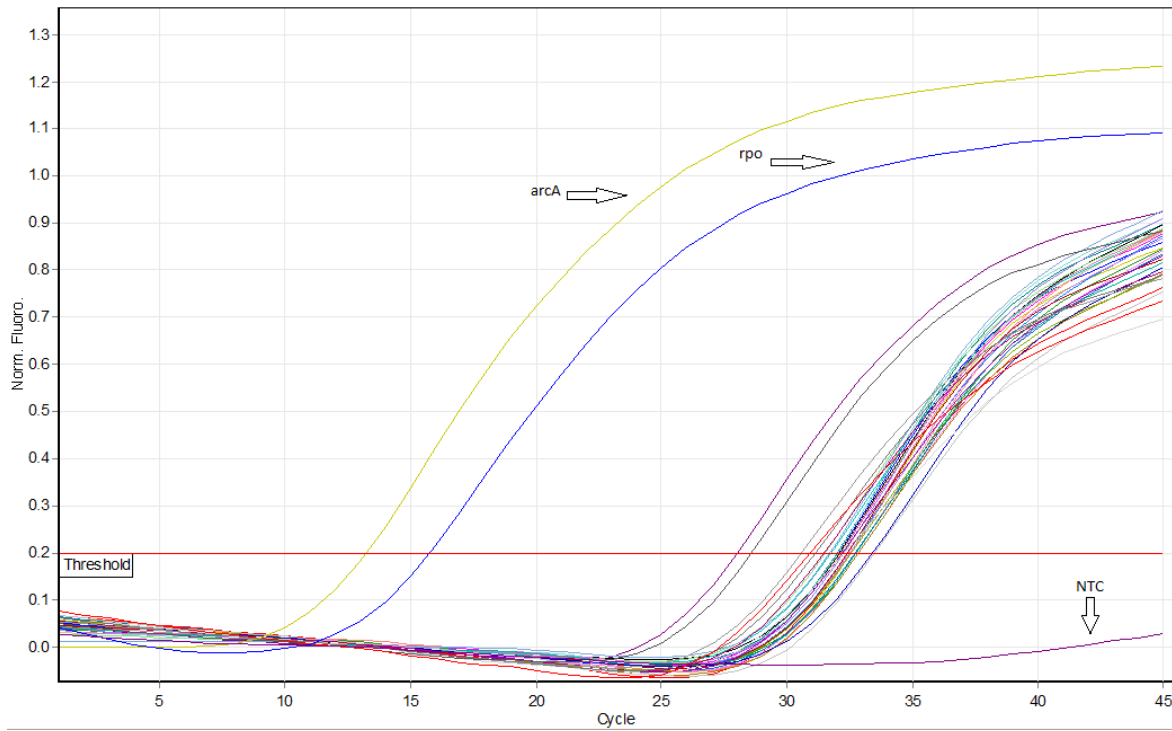


Figura 31. Expresión del gen *traT* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

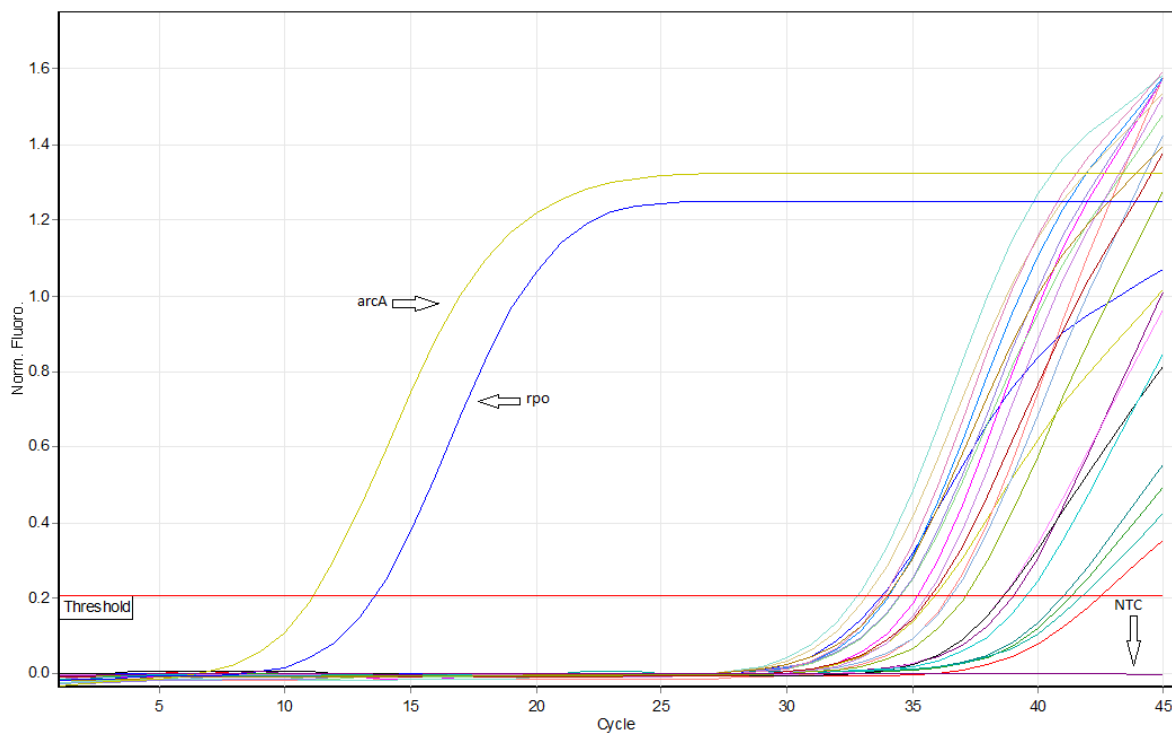


Figura 32. Expresión del gen *malX* por PCR en tiempo real. Se utilizaron los genes *arcA* y *rpo* como controles internos (House keeping), en la cepa de *E coli* ATCC 25922, y un control negativo NTC (control no templado).

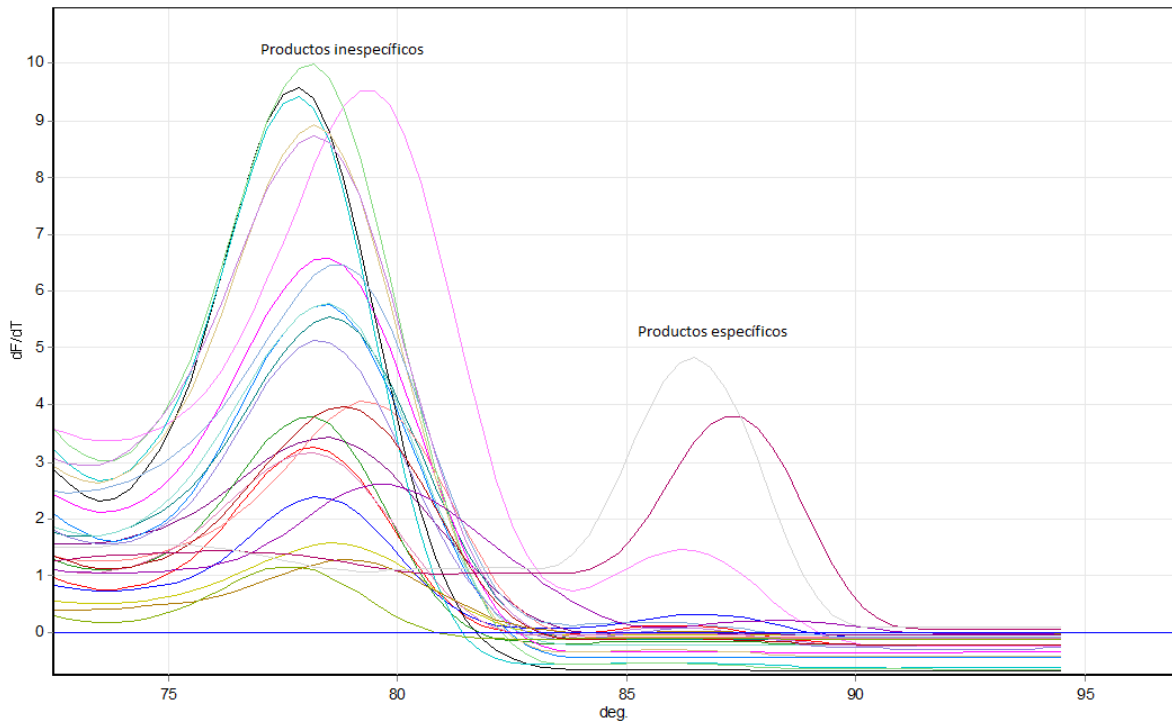


Figura 33. Curvas de fusión de los amplicones (melting curve) del gen *feoB*. Los picos en las curvas nos indican que los productos inespecíficos de la PCR en tiempo real tienen una temperatura de fusión mayor que los productos específicos.

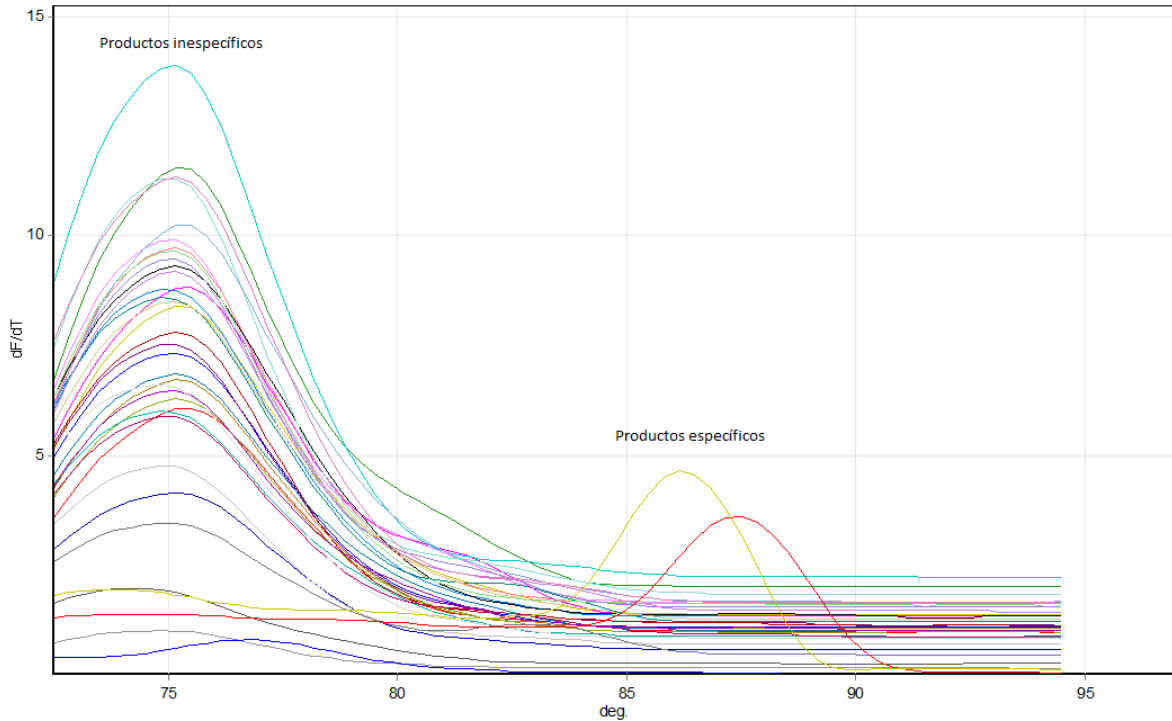


Figura 34. Curvas de fusión de los amplicones (melting curve) del gen *kpsMT*. Los picos en las curvas nos indican que los productos inespecíficos de la PCR en tiempo real tienen una temperatura de fusión mayor que los productos específicos.

Comparación de la expresión de los genes de acuerdo con el grado de enfermedad periodontal

En cuanto a la comparación del porcentaje de expresión de los tres diagnósticos estudiados (Tabla 6), los genes que codifican para adhesinas, toxinas, adquisición de hierro y protectinas presentaron un mayor porcentaje de expresión en el diagnóstico de las gingivitis con respecto a la periodontitis moderada y periodontitis crónica, en el caso del gen *malX* que codifica para las islas de patogenicidad, el mayor porcentaje de expresión obtenido fue en el diagnóstico de periodontitis modera.

Tabla 6. Comparación del porcentaje de expresión entre los tres diagnósticos estudiados.

Función	Gen	Gingivitis (n=12)	P. moderada (n=59)	P. crónica (n=29)
Adhesión	<i>fim</i>	66.7%	44.1%	48.3%
	<i>iha</i>	58.3%	34%	34.5%
	<i>afa</i>	25%	0%	6.9%
	<i>pap</i>	16.7%	16.9%	20.7%
	<i>sfa</i>	16.7%	8.5%	10.3%
	<i>papGII</i>	0%	5.1%	10.3%
	<i>papGIII</i>	0%	1.7%	0%
	<i>papGI</i>	0%	0%	0%
	<i>focG</i>	0%	0%	0%
	<i>bmaE</i>	0%	0%	0%
Toxinas	<i>usp</i>	25%	35.6%	31%
	<i>hlyA</i>	25%	3.4%	17.2%
	<i>astA</i>	16.7%	5.1%	6.9%
	<i>set1</i>	8.3%	6.8%	6.9%
	<i>cnf1</i>	8.3%	6.8%	3.5%
	<i>tsh</i>	0%	0%	0%
Adquisición de hierro	<i>feoB</i>	91.7%	81.4%	86.2%
	<i>fyuA</i>	75%	62.7%	55.2%
	<i>irp2</i>	75%	57.6%	62.1%
	<i>iroN</i>	25%	39%	31%
	<i>ireA</i>	16.7%	10.2%	3.5%
	<i>iuc</i>	0%	0%	0%
Protectinas	<i>traT</i>	75%	45.8%	48.3%
	<i>kpsMT</i>	58.3%	32.2%	31%
	<i>ompT</i>	33.3%	27.1%	27.6%
	<i>iss</i>	0%	6.8%	0%
PAIs	<i>malX</i>	33.3%	49.2%	41.4%

Patrones de expresión de genes de virulencia de *E. coli* periodontal.

En el caso del diagnóstico de gingivitis (Tabla 7) se encontraron un total de 12 patrones diferentes predominando los genes *feoB*, *fim*, *traT*, *fyuA*, *irp2* e *iha* que codifican para adquisición de hierro principalmente, adhesinas y protectinas.

Tabla 7. Patrones de expresión de genes de *E. coli* relacionados con la gingivitis (n=12).

	Patrón	No. de cepas	%
1	<i>afa/iroN/malX</i>	1	8.3
2	<i>fimH/iha/feoB/fyuA/kpsMT/traT</i>	1	8.3
3	<i>irp-2/feoB</i>	1	8.3
4	<i>papA/fimH/iha/hlyA/usp/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/traT</i>	1	8.3
5	<i>fimH/iha/hlyA/usp/iroN/irp-2/feoB/fyuA/ireA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	8.3
6	<i>papA/irp-2/feoB/ireA</i>	1	8.3
7	<i>fimH/astA/feoB/fyuA/traT</i>	1	8.3
8	<i>fimH/sfa/iha/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT</i>	1	8.3
9	<i>fimH/afa/iha/usp/astA/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	8.3
10	<i>fimH/sfa/cnf-1/hlyA/set-1/iroN/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	8.3
11	<i>fimH/afa/iha/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/traT</i>	1	8.3
12	<i>iha/irp-2/feoB/fyuA/traT</i>	1	8.3

Para el diagnóstico de periodontitis moderada (Tabla 8) se encontraron un total de 48 patrones diferentes, siendo el patrón *iroN/feoB* el que se encontró en 3 cepas, ambos genes codifican adquisición de hierro.

Tabla 8. Patrones de expresión de genes de *E. coli* relacionados con periodontitis moderada (n=59).

	Patrón	No. de cepas	%
1	<i>iroN/feoB</i>	3	5.1
2	<i>irp-2/feoB/malX</i>	1	1.7
3	<i>feoB/fyuA/malX</i>	1	1.7
4	<i>iha/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT</i>	1	1.7
5	<i>papA/iha/usp/iroN/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/traT/malX</i>	1	1.7
6	<i>papA/papGIII/fimH/iha/usp/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	1.7
7	<i>usp/irp-2/feoB/fyuA/malX</i>	1	1.7
8	<i>fimH/usp/astA/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	1.7
9	<i>sfa/iroN/irp-2</i>	1	1.7
10	<i>iha/iroN/feoB/malX</i>	1	1.7
11	<i>papA/iha/usp/irp-2/feoB/kpsMT/traT/malX</i>	1	1.7
12	<i>iha/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	1.7
13	<i>iha/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/traT/malX</i>	1	1.7
14	<i>papA/papGII/fimH/iha/usp/iroN/irp-2/feoB/ireA/ompT/traT/malX</i>	1	1.7
15	<i>fimH/irp-2/feoB/fyuA/ompT</i>	1	1.7
16	<i>irp-2/feoB/fyuA/traT</i>	1	1.7
17	<i>usp/fyuA/ireA/malX</i>	1	1.7
18	<i>fimH/usp/feoB/fyuA</i>	1	1.7
19	<i>iha/irp-2/feoB</i>	1	1.7
20	<i>fimH/irp-2/feoB</i>	1	1.7
21	<i>fimH/fyuA</i>	1	1.7
22	<i>feoB/fyuA</i>	1	1.7
23	<i>fimH/iroN/feoB/fyuA/ompT/traT</i>	1	1.7

24	<i>fimH/usp/irp-2/feoB/fyuA/iss/traT/malX</i>	1	1.7
25	<i>fimH/fyuA/ireA/traT/malX</i>	1	1.7
26	<i>fimH/usp/feoB/fyuA/traT/malX</i>	1	1.7
27	<i>fimH/cnf-1/usp/feoB/fyuA/malX</i>	1	1.7
28	<i>iha/cnf-1/usp/set-1/iroN/irp-2/feoB/fyuA/ireA/kpsMT/ompT/malX</i>	1	1.7
29	<i>iroN/feoB/malX</i>	1	1.7
30	<i>fimH/sfa/cnf-1/set-1/iroN/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/malX</i>	1	1.7
31	<i>fimH/usp/iroN/feoB/fyuA/malX</i>	1	1.7
32	<i>Iha/iroN/irp-2/iss/malX</i>	1	1.7
33	<i>fimH/iha/usp/set-1/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT</i>	1	1.7
34	<i>feoB/fyuA/traT</i>	1	1.7
35	<i>fimH/iroN/irp-2/feoB/fyuA/iss/traT</i>	1	1.7
36	<i>sfa/iroN/irp-2/feoB/kpsMT/traT</i>	1	1.7
37	<i>fimH/iha/usp/irp-2/feoB/kpsMT/traT/malX</i>	1	1.7
38	<i>papA/fimH/sfa/cnf-1/iroN/irp-2/feoB/kpsMT/traT/malX</i>	1	1.7
39	<i>papA/fimH/iha/usp/iroN/irp-2/fyuA/ireA/ompT/traT</i>	1	1.7
40	<i>iroN/irp-2/feoB</i>	1	1.7
41	<i>fimH/irp-2/feoB/fyuA/ompT/traT</i>	1	1.7
42	<i>iha/usp/astA/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	1.7
43	<i>papA/feoB/traT</i>	1	1.7
44	<i>fimH/iha/usp/iroN/feoB/fyuA/ireA/kpsMT/ompT/malX</i>	1	1.7
45	<i>papA/papGII/fimH/iha/hlyA/iroN/irp-2/feoB/fyuA/ompT/traT/malX</i>	1	1.7
46	<i>fimH/iha/usp/irp-2/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	1.7
47	<i>papA/sfa/hlyA/usp/iroN/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/traT</i>	1	1.7
48	<i>fimH/feoB/fyuA</i>	1	1.7

En cuanto al diagnóstico de periodontitis crónica (Tabla 9) se encontraron 22 patrones diferentes, el patrón *feoB/fyuA* se encontró en 2 cepas al igual que el patrón *fimH/afa/iha/usp/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX*.

Tabla 9. Patrones de expresión de genes de *E. coli* relacionados con periodontitis crónica (n=29).

	Patrón	No. de cepas	%
1	<i>feoB/fyuA</i>	2	6.9
2	<i>fimH/afa/iha/usp/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	2	6.9
3	<i>fimH/iha/usp/irp-2/fyuA/kpsMT/traT</i>	1	3.5
4	<i>fimH/iroN/irp-2/feoB/fyuA/traT</i>	1	3.5
5	<i>papA/papGII/iha/hlyA/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	3.5
6	<i>fimH/sfa/iroN/irp-2/feoB/traT/malX</i>	1	3.5
7	<i>fimH/usp/feoB/fyuA/ireA</i>	1	3.5
8	<i>fimH/irp-2/feoB/fyuA/malX</i>	1	3.5
9	<i>set-1/iroN/feoB</i>	1	3.5
10	<i>irp-2/feoB/fyuA</i>	1	3.5
11	<i>papA/papGII/fimH/iha/hlyA/usp/iroN/irp-2/fyuA/ompT/traT/malX</i>	1	3.5
12	<i>papA/fimH/sfa/iroN/feoB/traT</i>	1	3.5
13	<i>papA/iha/usp/irp-2/feoB/kpsMT</i>	1	3.5
14	<i>papA/sfa/iha/hlyA/usp/iroN/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/traT/malX</i>	1	3.5
15	<i>papA/papGII/fimH/iha/cnf-1/hlyA/usp/set-1/iroN/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX/</i>	1	3.5
16	<i>fimH/iha/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT</i>	1	3.5

17	<i>iroN/irp-2/feoB</i>	1	3.5
18	<i>fimH/iha/hlyA/usp/irp-2/feoB/fyuA/kpsMT/ompT/traT/malX</i>	1	3.5
19	<i>iroN/irp-2/feoB/fyuA/ompT/traT</i>	1	3.5
20	<i>fimH/irp-2/feoB/traT/malX</i>	1	3.5
21	<i>astA/irp-2/feoB</i>	1	3.5
22	<i>fimH/astA/feoB/malX</i>	1	3.5

DISCUSIÓN

Pacientes estudiados

En este estudio se analizó un grupo de pacientes con enfermedad periodontal, principalmente periodontitis moderada (59/100), seguido de periodontitis crónica (29/100) y gingivitis (12/100). La mayoría de estos pacientes fueron mujeres con una edad comprendida entre 44 a 57 años. Estos porcentajes son similares con los descritos por Taboada *et al.*, (2018) en un grupo de pacientes que acudieron a atención estomatológica de la Clínica Universitaria de Atención a la Salud de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, donde se analizaron a 73 pacientes, con un promedio de edad de 38.5 (± 9.6) años, de estos 34% (n=25) pertenecieron al sexo masculino y 66% (n=48) al femenino, siendo la prevalencia de gingivitis para el total de la población estudiada del 25% y de periodontitis del 75%.

La enfermedad periodontal, en conjunto con la caries, es uno de los padecimientos bucodentales con mayor prevalencia a nivel mundial. En México se ha reportado hasta en 70% de la población según la Academia Americana de Periodoncia (AAP) (Fernández, 2016). Se ha descrito que en la aparición de la enfermedad convergen factores genéticos, pero sobre todo tres bacterias (*Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* y *Treponema denticola*), del llamado complejo rojo, dicho grupo tiene en común que son anaeróbicas estrictas, poseen una alta virulencia y tienen la capacidad de los invadir tejidos (Fernández, 2016).

Recientemente se ha descrito a *Escherichia coli* como un patógeno emergente secundario asociado a infecciones periodontales. En este estudio se analizó un grupo de cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con distinto nivel de enfermedad periodontal. En la enfermedad periodontal existe factores que incrementan la prevalencia, como la edad, el tabaquismo, alcoholismo, la diabetes mellitus, cáncer SIDA, etc., como lo demuestra el estudio realizado en pacientes infectados por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), donde se observó que un poco más de la mitad presentó enfermedad periodontal (59.7%) y algunos otros presentaron enfermedad gingival (31%). En estos pacientes se identificaron bacilos Gram

negativos como; *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* (Pereyra, 2010).

La presencia de *E. coli* en cepas periodontales ha sido muy poco estudiada, sin embargo, recientemente se realizó un amplio estudio sobre el genotipo de virulencia, relacionado con el fenotipo de resistencia a los antibióticos, la cuantificación de la formación de biopelícula, y la identificación de los filogrupos en un grupo de cepas periodontales (Hernández *et al.*, 2022).

Expresión de genes de virulencia que codifican para adhesinas.

La adherencia es el primer paso para la colonización y posterior infección del hospedero, este proceso es muy importante ya que, si no se adhieren, suelen ser eliminadas por secreciones mucosas y otros líquidos que bañan las superficies de los tejidos (Vignoli, 2017).

En este trabajo los genes de adhesión expresados con mayor frecuencia después del modelo *in vitro* de infección de la línea celular epitelial humana A459 fueron *fim* (n=48/100), seguido de *iha* (37/100), *pap* (18/100) y *sfa* (10/100), mientras que los genes *papGII*, *afa* y *papGIII* se expresaron en menos del 10% y los genes *papGI*, *focG* y *bmaE* no se expresaron en ninguna de las cepas estudiadas (Tabla 2). Los porcentajes de expresión de los genes de adhesión encontrados en las cepas periodontales de *E. coli* son semejantes a los descritos en cepas UPEC aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU), donde los genes expresados con mayor frecuencia fueron *iha* (64.9%) y *fim* (58.2%) (Paniagua, 2017), y también son parecidos con los descritos en cepas patógenas cérvico-vaginales de *E. coli* de mujeres mexicanas, donde los genes expresados con más frecuencia fueron *fimH* con un 89.5%, seguido *sfa* con 10%, *focG* con 6% y *afa* con un 3.5% (Monroy, 2020). La expresión de los genes de adhesión en las cepas periodontales de *E. coli* no había sido estudiados en México, ni en otra parte del mundo, por lo que suponemos que la elevada frecuencia de estos genes podría ocasionar infecciones periodontales agudas o crónicas, debido a que se ha descrito que *fimH* se asocia a

procesos agudos como cistitis y pielonefritis, mientras que *iha* se asocia a infección de tracto urinario (ITU).

Expresión de genes de virulencia que codifican para toxinas.

La producción de toxinas bacterianas durante el desarrollo de las infecciones permite la degradación de los tejidos, la penetración y la multiplicación bacteriana debido a la captación de hierro (Cárdenas, 2014). En este estudio se detectó que el mayor porcentaje de expresión en las cepas periodontales de *E. coli* fue para *usp* (33/100), seguido de *hlyA* (10/100), *set1* y *astA* (7/100) en cada caso y *cnf1* (6/100). Estos porcentajes de expresión son semejantes con los descritos previamente en cepas aisladas de pacientes con infecciones del tracto urinario (ITU), donde los genes de toxinas expresados con mayor frecuencia entre las cepas fueron *usp* (68%), *set* (31.4%) y *astA* (30.9%) (Paniagua, 2017). El porcentaje de expresión de *cnf-1* en las cepas periodontales de *E. coli* es inferior al 33.5% descrito en cepas cérvico-vaginales de *E. coli*, mientras que el porcentaje de expresión de *astA* (7/100) en las cepas periodontales es superior al 2% reportado en las cepas cérvico-vaginales de *E. coli* (Monroy, 2020). La elevada frecuencia de los genes de toxinas en las cepas periodontales evidencia la capacidad para ocasionar infecciones agudas en los pacientes, principalmente en los adultos mayores con alguna otra comorbilidad.

Expresión de genes de virulencia que codifican para sistemas de adquisición de hierro (sideróforos).

El hierro es un nutriente esencial para la vida de los seres vivos, participando en múltiples procesos metabólicos. Sin embargo, la concentración de hierro libre en el cuerpo es relativamente baja y con el fin de obtenerlo, algunas bacterias secretan proteínas denominadas sideróforos, que son compuestos de bajo peso molecular que atrapan hierro con alta afinidad (Vignoli 2017; Cárdenas, 2014). En este estudio

los genes que codifican para sistemas de adquisición de hierro expresados con mayor frecuencia fueron, *feoB* (84/100), seguido de *fyuA* (62/100), *irp2* (61/100) e *iroN* (35/100). El porcentaje de expresión de *irp2* detectado en las cepas periodontales es inferior al 48.4% descrito en cepas UPEC aisladas de infecciones de vías urinarias (Paniagua, 2017), mientras que los porcentajes para *irp2* e *iroN* son semejantes a los descritos en cepas cervico-vaginales de *E. coli* (Monroy, 2020). La elevada frecuencia de expresión de los genes de adquisición de hierro en las cepas periodontales de *E. coli* evidencia la capacidad de las cepas para multiplicarse y ocasionar procesos infecciosos periodontales crónicos. El gen *feoB* expresado en estas cepas pertenece a un sistema bacteriano de transporte de hierro ferroso descubierto por primera vez en *Escherichia coli* K-12, que consta de tres genes, *feoA*, *feoB* y *feoC* (*yhgG*). Se cree que *feoB* es el principal transportador transmembrana y ha sido asociada a la virulencia tanto en *E. coli* como de *Helicobacter pylori*, *Legionella pneumophila* y *Campylobacter jejuni* (Lau et al, 2013).

Expresión de genes de virulencia que codifican para protectinas.

Las protectinas son un conjunto de proteínas que ayudan a la evasión de la respuesta inmune del hospedero (Ávalos, 2000). En este estudio los genes de protectinas expresados con mayor frecuencia fueron *traT* (50/100), *kpsMT* (35/100) y *ompT* (n=28/100), que son semejantes a los descritos en cepas cervico-vaginales de *E. coli*, cuyos porcentajes de expresión para *kpsMTII* fue del 72.5% (n=145), y *ompT* del 24% (n=48) (Monroy, 2020), mientras que la expresión de *kpsMTII* en las cepas periodontales es inferior al descrito en cepas UPEC provenientes de infecciones del tracto urinario (ITU) que fue del 61.3% (Paniagua, 2017). La elevada frecuencia de los genes de protectinas en las cepas de *E. coli* periodontales pone de manifiesto la capacidad de las cepas para ocasionar infecciones crónicas, debido a que el antígeno capsular K codificado por el gen *kpsMT* protege a la bacteria contra la fagocitosis y los genes *traT* e *iss* incrementan la resistencia al suero (Hernández, 2022).

Expresión de genes de virulencia que codifican para islas de patogenicidad.

Las islas patogénicas, son segmentos de DNA bacteriano que portan uno o más genes de virulencia, los cuales han sido adquiridos en bloque de una fuente externa (Fernández, 2004). En este estudio el gen *malX* asociado a una isla de patogenicidad se expresó en el 45% (n=45) de las cepas periodontales de *E. coli*. La expresión del gen *malX* no ha sido estudiada, sin embargo, la frecuencia fue descrita en cepas UPEC (n=194), donde se analizaron los patrones de genes de virulencia y resistencia a antibióticos asociada a los grupos filogenéticos, donde el gen *malX* fue detectado en el 12.4% (n=24). La presencia del gen *malX* en las cepas periodontales de *E. coli* evidencia la virulencia de las cepas para ocasionar infecciones agudas, debido a que este gen demuestra de manera indirecta la presencia de la isla de patogenicidad (PAIs), que puede acarrear numerosos genes de virulencia.

Patrones de expresión de genes en cepas de *E. coli*

En este estudio se analizaron los diferentes patrones de expresión de los genes de virulencia en las cepas periodontales de *E. coli* relacionados con el grado de enfermedad periodontal.

En el caso de la gingivitis, se encontraron un total de 12 patrones diferentes, mientras que para las cepas provenientes de periodontitis moderada se encontraron un total de 48 patrones diferentes y para la periodontitis crónica se encontraron 22 patrones diferentes. La frecuencia de los distintos patrones fueron previamente estudiados por Paniagua *et al.* (2018) en cepas UPEC, donde se encontraron 72 patrones diferentes de marcadores de virulencia. La elevada frecuencia de los diferentes patrones de expresión en las cepas periodontales de *E. coli* pone de manifiesto que durante la gingivitis, la periodontitis moderada o la periodontitis crónica, ocurre de manera simultánea la participación colectiva de los diferentes genes de virulencia, que ayudan a colonizar, degradar los tejidos del hospedero, y

a evadir la respuesta inmune del hospedero favoreciendo la cronicidad y/o la agudeza de las infecciones periodontales.

CONCLUSIONES

1. *E. coli* se presentó como un colonizador secundario de la enfermedad periodontal en los pacientes estudiados, principalmente en mujeres, con el diagnóstico de periodontitis moderada.
2. Los genes de adhesión expresados con mayor frecuencia entre las cepas de *E. coli* fueron *fim* e *iha*, de toxinas *usp*, de adquisición de hierro *feoB*, *fyuA* e *irp2* y de protectinas *traT*, *kpsMT* y *ompT*.
3. La mayoría de las cepas de *E. coli* fue portadora del gen *malX* (PAIs).
4. Se encontró una alta distribución de los diferentes patrones de expresión de los genes de adhesión, toxinas, sistemas de adquisición de hierro y protectinas relacionados con la gingivitis, la periodontitis moderada o la periodontitis crónica en las cepas de *E. coli*.
5. Los resultados encontrados en este estudio demostraron una elevada expresión del viruloma de *E. coli* periodontal, por lo que estos hallazgos pueden ayudar a mejorar los tratamientos médicos contra este patógeno emergente asociado a la enfermedad periodontal.

REFERENCIAS

1. Arias, E. (2009). Detección de *Escherichia coli* mediante interacción de las fimbrias tipo 1 con polímeros y oligómeros fenilnetileno funcionalizados con manosa. [Tesis de Maestría en Tecnología de Polímeros, Centro de investigación en Química Aplicada, Saltillo, Coahuila].
<https://ciga.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1025/268/1/Enrique%20Arias%20Arciniegas.pdf>
2. Ávalos, G., López, L., García, V., & Ugalde, M. (2000). Principales factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos humanos. *Educación química*, 11(2), 274-283.
3. Botero, E. y Bedoya, E. (2010). Determinantes del Diagnóstico Periodontal. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral*, 3(2), 94-99.
<https://scielo.conicyt.cl/pdf/piro/v3n2/art07.pdf>
4. Cárdenas, M., Cruz y López, O, Gándara, J. & Pérez, M. (2014). Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos* 94, 35-43.
<https://elementos.buap.mx/directus/storage/uploads/00000001145.pdf>
5. Clínica Oliver Coll. (2018). ¿Qué es la Periodontitis crónica y cuál es el mejor tratamiento?. *Salut-Estética dental*.
<https://clinicadentalolivercoll.com/blog/que-es-la-periodontitis-cronica-y-cual-es-el-mejor-tratamiento/>
6. Corbett, D. y Roberts, I. (2008). Capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, (65), 1-26.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(08\)00601-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(08)00601-1)
7. Emamghorashi F., Farshad. S, & Kalani, M. (2011). Relationship Between O Serotype and Virulent Genes in *Escherichia Coli* Causing Urinary Tract Infections. *Iranian Journal of Kidney Diseases*. 5(4). 234-237.
8. Escudero, N., Perea, M. y Bascones, A. (2008), Revisión de la periodontitis crónica: Evolución y su aplicación clínica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*, 20(1).

https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852008000100003

9. Ewers, C., *et al.* (2007). Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they?. *International Journal of Medical Microbiology* 297, 163-176.
10. Fernández, A. (2016). En México, la enfermedad periodontal tiene una prevalencia de 70 por ciento. *Boletín UNAM-DGCS-476*. https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2016_476.html#:~:text=La%20enfermedad%20periodontal%20es%2C%20junto,de%2065%20a%C3%B1os%20en%20adelante).
11. Fernández, S., Alonso, G. & Toro, E. (2004). Estructura de mosaico del cromosoma bacteriano: Islas patogénicas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 35(2). http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-04772004000200005
12. Hernández, T. (2017). Patrones de expresión de marcadores de virulencia en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas. [Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México]. <http://132.248.9.195/ptd2017/octubre/0766271/0766271.pdf>
13. Hernández, T., Monroy, E., Garzón, J., Morales, R., Navarro, A., García, L., Nolasco, N., Gaytán, F., Moreno, M., Vaca, F., Rojas, E., & Paniagua, G. (2022). High Virulence and Multidrug Resistance of *Escherichia coli* Isolated in Periodontal Disease. *Microorganisms*, 11(1), 45. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010045>
14. Highfield, J. (2009). Diagnosis and classification of periodontal disease. *Australian dental journal*, 54(1). [10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x](https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2009.01140.x)
15. Khan, A., Khan, K., Ghaza, M., Dave, T., Shahnoor, S., Khan, M., Oduoye, M., Nafula, W., & Ubechu, S. (2023). Celebrating breakthrough in dental diagnostics: FDA approval of an AI model for diagnosis of periodontal diseases: A correspondence. *Health science reports*. 6(9). <https://doi.org/10.1002/hsr2.1573>

16. Lau, C., Ishida, H., Liu, Z. y Vogel, HJ. (2013). Solution structure of *Escherichia coli* FeoA and its potential role in bacterial ferrous iron transport. *Journal of Bacteriology*. 195: 46-55. [10.1128/JB.01121-12](https://doi.org/10.1128/JB.01121-12)
17. López, D., Carrillo, E., Leyva, M., Orozco, G., Manjarrez, Á., Arroyo, S., Moncada, D., Villanueva, S., Xicohtencatl, J., & Hernández, R. (2014). Identification of virulence factor genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed research international* 2014, 959206. <https://doi.org/10.1155/2014/959206>
18. Manjarrez, Á. (2012). *Escherichia coli* uropatógena, una bacteria peligrosa. Universidad Nacional Autónoma de México. Boletín UNAM-DGCS-443. https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2012_443.html#:~:text=A%20estos%20tipos%20de%20bacterias,virulencia%20y%20sintomatolog%C3%ADa%20cl%C3%ADnica%20comunes.&text=De%20las%20causas%20de%20padecimientos,que%20atacan%20el%20tracto%20urinario.
19. Matesanz, P, Matoz, R. y Bascones, A. (2008). Enfermedades gingivales: una revisión de la literatura. *Av Periodon Implantol*, 20(1), 11-25. <https://scielo.isciii.es/pdf/peri/v20n1/original1.pdf>
20. Mayo Clinic. (2020). Periodontitis. <https://www.mayoclinic.org/es/diseases-conditions/periodontitis/symptoms-causes/syc-20354473>
21. Medina, A. (2010). Efecto de las enterobacterias en pacientes con periodontitis crónica. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral*. 22(1). https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-65852010000100004
22. Mombelli, A. (2000). Microbial colonization of the periodontal pocket and its significance for periodontal therapy, *Periodontology* 2000. 76(1), 85-96. <https://doi.org/10.1111/prd.12147>
23. Monroy, E., Cerón, A., García, L., Alonso, N., Domínguez, P., Hernández, T., Bustos, J., Hamdan, A., Rojas, E., Vaca, S., Vaca, F., & Paniagua, G.

- (2020). Virulence gene transcription, phylogroups, and antibiotic resistance of cervico-vaginal pathogenic *E. coli* in Mexico. PloS one, 15(6), e0234730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234730>
24. Ortiz-Vigón. (2018). El “abc” de las enfermedades periodontales. Salud y estética dental. <https://ortizvigon.com/abc-enfermedades-periodontales/>
25. Paniagua, G., Monroy, E., Bautista, A., Reyes, R., Vicente, A., Vaca, F., Díaz, C., Martínez, S., Domínguez, P., García, L., Uribe, A., & Vaca, S. (2018). Multiple antibiotic resistances and virulence markers of uropathogenic *Escherichia coli* from Mexico. Pathogens and global health, 112(8), 415-420. <https://doi.org/10.1080/20477724.2018.1547542>
26. Paniagua, G., Hernández, T., Monroy, E., Vaca, F., Díaz, C., Uribe, A., & Vaca, S. (2017). Comprehensive expression análisis of pathogenicity genes in uropathogenic *Escherichia coli* strains. Microbial pathogeneis, 103, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2016.12.008>
27. Paniagua, G., Monroy, E., García, A. y Vaca, S. (2016). PCR, Análisis molecular, Caracterización de bacterias y levaduras de interés médico. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
28. Paniagua, G., Monroy, E. y Vaca, S. (2011). PCR en tiempo real para detectar *Candida albicans*. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.
29. Pakbin, B., Brück, W., & Rossen, J. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. International journal of molecular sciences, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
30. Pereyra, T., Yáñez, I. y Reyes, L. (2010). Prevalencia de periodontitis causada por sobreinfecciones en pacientes con infección por virus de la inmunodeficiencia humana. Revista Mexicana de Periodontología. 1(1). <https://www.medigraphic.com/pdfs/periodontologia/mp-2010/mp101d.pdf>
31. Rojas, N. (1995). El lipopolisacárido bacteriano: Una potente endotoxina con múltiples actividades biológicas. Recientes avances en estructura, genética y bioquímica. Revista costarricense de Ciencias Médicas.

- Biblioteca Nacional de Salud y Seguridad Social.
<https://repositorio.binasss.sa.cr/repositorio/handle/20.500.11764/3466>
32. Reyes, A. (2011). *Escherichia coli*. Universidad Veracruzana.
<https://www.uv.mx/personal/sbonilla/files/2011/06/escherichia-coli-i.pdf>
 33. Schäfer, K. (2011). La periodontitis encabeza la lista de problemas de salud pública. Higienistas y auxiliares: periodoncia. Quintessence ed. esp., 24 (10), 583-588. <https://www.elsevier.es/es-revista-quintessence-9-articulo-la-periodontitis-encabeza-lista-problemas-X0214098511637909>
 34. SEM. (2016). Pared celular Gram negativa. Sociedad Española de Microbiología.
 35. Soto, S. (2006). Expresión de factores de virulencia en cepas extraintestinales de *Escherichia coli*. Servicio de Microbiología. Hospital Clínico de Barcelona, España. *Enferm. Infecc. Microbiol*, 24(8), 479-480.
 36. Taboada, O., Cerón, J., & Rodríguez, A. (2018). Frecuencia y distribución de enfermedades periodontales asociadas a placa bacteriana en pacientes que acuden a una clínica universitaria. *Revista ADM*, 75(3), 147-152. <https://www.medigraphic.com/pdfs/adm/od-2018/od183f.pdf>
 37. Vieira, A. P., Magalhães, C. B., Hartenbach, F. A., Martins do Souto, R., & Maciel da Silva-Boghossian, C. (2016). Periodontal-disease-associated biofilm: A reservoir for pathogens of medical importance. *Microbial pathogenesis*, 94, 27-34. [10.1016/j.micpath.2015.09.009](https://doi.org/10.1016/j.micpath.2015.09.009)
 38. Vignoli, R. (2017). *Escherichia coli* patógeno extra intestinal (ExPEC): Atributos de virulencia, Epidemiología Molecular y Resistencia a Antibióticos. [Tesis de Doctorado Área Biología, Sub-área Microbiología, Instituto de Higiene-Facultad de Medicina, Montevideo, Uruguay].
<https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/bitstream/20.500.12008/10229/1/uy24-18517.pdf>