

# Expresión del gen *esp* (*enterococcus surface protein*) de *enterococcus faecalis* en un modelo *in vitro* de dientes extraídos

## Gene expression *esp* (*enterococcus surface protein*) of *enterococcus faecalis* in an *in vitro* model of extracted teeth

Covo Morales E\*, Díaz Caballero A\*\*, Simancas Pallares M\*\*\*

### RESUMEN

**Objetivo:** Determinar la presencia y expresión del gen *esp* en cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* a partir de un modelo *in vitro* de dientes extraídos.

**Métodos:** Se diseñó un sistema *in vitro* para evaluar la formación del biofilm mediante microscopía de fluorescencia y la expresión del gen *esp*. El sistema estuvo constituido por un diente humano previamente extraído, cortado y preparado que proporcionó, mediante su conducto radicular, una superficie adecuada para la formación del biofilm por parte de *E. faecalis*. El sistema dispuso de una cámara anaerobia que permitió el crecimiento de la bacteria en el caldo de cultivo y evitó su contaminación con otros microorganismos. Esta cámara estuvo constituida por un tubo de micro centrifuga estéril, cortado y unido por el extremo inferior al extremo apical del diente seccionado.

**Resultados:** Los resultados que se obtuvieron tanto por microscopía de fluorescencia como por RT-PCR permitieron cuantificar el nivel de expresión del gen *esp* en las bacterias durante su crecimiento y formando el biofilm en la superficie de los conductos radiculares. Todas las cepas evaluadas presentan el gen *esp*. Sin embargo, el biofilm de la cepa CC02 expresó el gen *esp* cuatro veces más en comparación al gen *esp* de la cepa de referencia.

**Conclusión:** La expresión del gen *esp* podría estar asociada con la formación de biofilm en *E. faecalis* y la adherencia a superficies abióticas. Podría convertirse en una diana terapéutica prometedora en los programas de control de infecciones persistentes por *Enterococcus spp.* asociados a la presencia de biofilm.

**Palabras clave:** Genes, biofilm, *Enterococcus faecalis*, endodoncia.

### SUMMARY

**Objective:** To determine the presence and expression of *Enterococcus faecalis* Esp gene in several strains from an *in vitro* model on extracted teeth.

**Methods:** An *in vitro* system was designed to evaluate the biofilm formation through fluorescence microscopy and gene expression that could be associated to biofilm formation. The system consisted of a previously extracted human tooth that was cut and prepared to provide by means of its root canal, an adequate surface for biofilm formation on behalf of *Enterococcus faecalis*. The system disposed an anaerobe chamber that allowed the growth of bacteria in broth culture and avoided contamination with other microorganisms. This

\* Odontólogo. Universidad de Javeriana. Especialista en Endodoncia. Universidad Javeriana. Magíster en Microbiología. Universidad de Cartagena. Profesor titular. Universidad de Cartagena.

\*\* Odontólogo Universidad de Cartagena. Especialista en Periodoncia Universidad Javeriana. Magíster en Educación Universidad del Norte. Doctor en Ciencias Biomédicas Universidad de Cartagena. Profesor titular Universidad de Cartagena. Grupo GITOUC.

\*\*\* Odontólogo Universidad de Cartagena. Magíster en Epidemiología Universidad Nacional. Profesor Universidad de Cartagena.

chamber consisted of a sterile micro centrifuge tube, which was cut and united by its inferior end to the apical end of the sectioned tooth.

**Results:** The results obtained with fluorescence microscopy and RT-PCR allowed the quantification of the *Esp* gene levels of expression in bacteria growing and forming biofilm in root canal surfaces.

**Conclusion:** The expression of *Esp* gene is associated with biofilm formation in *E. faecalis* and in the adherence to abiotic surfaces. It could be a promising therapeutic target in control programs for the eradication of persistent infections associated with the presence of *E. faecalis* in biofilm.

**Key words:** Genes, biofilms, *enterococcus faecalis*, endodontics.

**Fecha de recepción:** 30 de enero de 2016.

**Aceptado para publicación:** 24 de febrero de 2016.

Covo Morales E, Díaz Caballero A, Simancas Pallares M. Expresión del gen *esp* (enterococcus surface protein) de *enterococcus faecalis* en un modelo *in vitro* de dientes extraídos. *Av. Odontostomatol* 2016; 32 (4): 195-204.

## INTRODUCCIÓN

El biofilm es una estructura compleja de asociación de microorganismos similares y de diferentes especies bacterianas, que se organizan en forma de un supraorganismo con características superiores a las que presentan las bacterias individualmente (1).

El principio de la formación del biofilm se establece como parte de los procesos que se pueden presentar en el *quórum sensing* (QS). Las bacterias mantienen una comunicación permanente entre ellas, dentro de los diferentes ambientes o microambientes donde permanecen y conviven. Los mecanismos de comunicación, le permiten reconocer cuando se alcanza el umbral o nivel de presencia, para desarrollar nuevas funciones, especialmente un comportamiento social, simbiótico y de permanente reconocimiento, útil para las tareas que adquieren en el mecanismo de QS (2). Este biofilm puede establecerse en cualquier superficie orgánica o inorgánica, que es la superficie del sustrato donde los microorganismos planctónicos prevalecen en una solución a base de agua. En las superficies dentales, la estructura del biofilm se establece durante la fijación de las bacterias a los dientes para formar la placa dental. Aquí, los organismos planctónicos constituyen la fuente principal de la organización de este biofilm específico (3). Los microorganismos en el biofilm asumen un potencial patógeno más fuerte que los de un estado planctónico. A partir de esto, la

formación del biofilm tiene gran importancia clínica, no sólo por los mecanismos de defensa del huésped, sino también por los esfuerzos terapéuticos, incluidos los tratamientos químicos, mecánicos y medidas antimicrobianas, que son más difíciles de tratar en forma de biofilm (3).

Las infecciones endodónticas, el concepto de biofilm toma gran importancia en el manejo de infecciones pulpares con compromiso de los tejidos periapicales. Estas agregaciones bacterianas son la causa principal de la resistencia de la periodontitis apical. Aunque no se describe con detalle, se han observado las condensaciones bacterianas en las paredes de los canales infectados, lo que sugiere que los mecanismos de formación de biofilm también pueden existir dentro del espacio del conducto radicular (4). El *Enterococcus faecalis* es el principal microorganismo que se asocia a los fracasos de tratamientos endodónticos. Es por ello que es de gran importancia el conocimiento de su mecanismo de patogenicidad y las expresiones genéticas de los factores que favorecen la formación del biofilm (5).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Tipo de estudio

Se realizó un estudio de tipo observacional de corte transversal en el que se midió la expresión del gen

*esp* por varias cepas clínicas de *E. faecalis* en un modelo *In Vitro* de dientes extraídos.

### Muestra

La muestra de estudio estuvo conformada por 3 cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* aisladas a partir de pacientes con necrosis pulpar, las cuales fueron aisladas y almacenadas en el banco de muestras del grupo de investigación GITOUIC. Además, se utilizó una cepa referencia de *E. faecalis* (ATCC 29212) adquirida del *American type culture*.

### Recolección de datos

#### Identificación de cepas clínicas

Las cepas clínicas aisladas de conductos radiculares de pacientes con lesión apical fueron cultivadas en agar nutritivo durante 24 horas a 37° C en condiciones anaeróbicas. Al terminar el período de incubación, se depositó una muestra de cada cepa sobre una placa portaobjetos y se realizó una tinción de gram. Las placas fueron visualizadas en microscopio óptico con objetivo de 100× y aceite de inmersión, lo que permitió identificar cocos gram positivos agrupados en parejas o en cadenas cortas. A partir del mismo cultivo bacteriano se realizó una prueba de catalasa, la cual arrojó resultado negativo para las muestras de estudio. Para confirmar la identidad de las cepas clínicas se realizó la extracción del ADN de cada cepa y se realizó una PCR con primeros específicos para género *Enterococcus* y primer específicos para *E. faecalis* (Tabla 1) utilizando el kit de PCR GoTaq® Green Master Mix (Promega).

### Cultivos bacterianos

Las bacterias fueron cultivadas en medio TSB (Caldo Triptona de Soja, Oxoid) durante 24 horas y la concentración bacteriana en términos de UFC/ml fue determinada usando un espectrofotómetro (Termo Scientific) ajustando la longitud de onda a 620 nm. La concentración bacteriana fue ajustada a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL con solución salina.

### Preparación de los dientes

A 11 dientes anteriores unirradiculares humanos recién extraídos y con cemento radicular intacto, se les realizaron radiografías periapicales; posteriormente, la apertura cameral y localización del canal con fresa redonda # 2 microdont con pieza de alta velocidad (NSK - Hoffman Estates, IL - USA) fueron preparados e instrumentados con limas tipo K Flexofile (Dentsply Maillefer, Tulsa - Oklahoma, USA) de 31 mm desde lima 15 hasta lima 50 con irrigación profusa entre lima y lima con hipoclorito de sodio al 5,25% (Eufar Laboratories. Bogotá, Colombia) para extraer el tejido, eliminar detritus y desinfectar el conducto. Para ampliar los conductos en los dos tercios cervicales se utilizaron fresas Gates glidden # 1 y 2 (Kerr Corp., West Collins, Orange - CA, USA), y finalmente, retroceso hasta la lima 80. Una vez preparados, cada diente fue cortado transversalmente en su extremo coronal por medio de un disco diamantado, midiendo 14 mm desde apical a lo largo de la raíz. Se realizaron radiografías utilizando radiografía periapical convencional con películas tipo E (Eastmann Kodak Company, NY, USA) de las cavidades de acceso estándar y un tercio del conducto radicular; se procede a su esterilización en autoclave

**TABLA 1.- PRIMEROS ESPECÍFICOS PARA GÉNERO *ENTEROCOCCUS* Y *E. FAECALIS***

Oligonucleótido	Secuencia	Especificidad	Tamaño del amplicón
EntG-F	TACTGACAAACCATTCATGAT	16S rRNA	112 pb
EntG-R	AACTTCGTCACCAACGCGAAC		
Efaec-F	CCGAGTGCTTGCCTCAATTGG	16S rRNA	137 pb
Efaec-R	CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC		

por 30 minutos. Posteriormente cada diente fue adherido al extremo cortado de un tubo eppendorf estéril de 1,5 mL, sellado con resina epóxica y luego barnizado desde la raíz hasta la parte inferior del tubo con esmalte. El sistema se dejó secar durante 24 horas.

### ***Inoculación del sistema***

El proceso de inoculación de los dientes se realizó en una cabina de flujo laminar tipo 2. Con la ayuda de una micropipeta estéril de 20  $\mu$ L, fueron depositados aproximadamente 20  $\mu$ L de la suspensión bacteriana en el conducto radicular de cada diente; el tubo fue tapado e incubado a 37° C durante 15 días reemplazando la suspensión bacteriana cada 48 horas. El esquema de inoculación de los dientes fue el siguiente:

- Tres dientes fueron inoculados con la cepa de referencia *E. faecalis* (ATCC 29212) de los cuales uno fue utilizado para el ensayo de fluorescencia y dos para la extracción de ADN; 3 dientes fueron inoculados con la cepa clínica CC1, utilizados de igual forma que el anterior.
- Dos dientes fueron inoculados con la cepa clínica CC2, ambos utilizados para el ensayo de expresión génica.
- Dos dientes, con la cepa clínica CC3, utilizados de igual forma, y
- Un diente fue utilizado como control negativo utilizado en el ensayo de fluorescencia.

### ***Análisis por microscopia de fluorescencia***

Transcurrido el tiempo de incubación, los dientes destinados para el ensayo de fluorescencia fueron lavados con solución salina dos veces y luego removidos del tubo, cada diente fue cortado longitudinalmente con pieza de baja velocidad (NSK - Hoffman Estates, IL - USA) con la ayuda de un disco diamantado como se indica el corte.

### ***Tinción de biofilm***

Para evidenciar la formación de biofilm, las bacterias adheridas a la pared del conducto radicular fueron

teñidas con el kit LIVE/DEAD® BacLight® Bacterial Viability; para esto se preparó 1 mL del colorante en un tubo de micro centrífuga de 1,5 mL. Cada diente fue sumergido en la solución de fluorescencia durante 15 minutos. Luego, cada sección fue lavada con solución salina, montada en una placa portaobjetos y visualizada en un microscopio de fluorescencia (Leica Microsystems GmbH - Wetzlar - Germany) con objetivos de 5 $\times$ , 10 $\times$  y 20 $\times$ , utilizando el filtro I3 (450-490 nm) el cual excita el colorante SYTO 9 utilizado en la tinción.

### ***Análisis de expresión génica***

El RNA mensajero de las bacterias formando biofilm y creciendo en caldo fue extraído usando el kit QIAzol Lysis Reagent (Qiagen - Venlo, Limburg - Netherlands). Para las bacterias que crecieron sobre las paredes del conducto radicular se utilizaron 75  $\mu$ L del reactivo, los cuales fueron depositados en el conducto de cada diente y dejados 30 segundos a temperatura ambiente antes de ser retirados por inversión sobre un nuevo tubo vacío. Para las bacterias que crecieron en caldo se utilizaron 150  $\mu$ L del QIAzol, los cuales se depositaron sobre el botón de bacterias obtenido por centrifugación. La calidad y concentración del RNA mensajero extraído a partir de cada diente fue determinada mediante un espectrofotómetro NanoDrop (ThermoScientific - Waltham, MA, USA) a 260 y 280 nanómetros.

### ***Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)***

La transcripción reversa y PCR fue llevada a cabo en un solo paso mediante el Kit AccesQuick™ RT-PCR System (Promega - Madison, WI - USA). Se utilizó 1  $\mu$ g de RNA para cada reacción y primeros para los genes 16S rRNA (housekeeping) y *esp* (secuencia reportada por Toledo-Arana) (6). Los tubos fueron incubados a 45° C durante 45 minutos para llevar a cabo la transcripción reversa e inmediatamente sometidos a 95° C por 5 minutos y a 40 ciclos de 94° C por 1 minuto, 50° C por 1 minuto y 72° C por 1 minuto, más una etapa final de extensión a 72° C por 5 minutos, en un termociclador (Perkin Elmer - Waltham, MA - USA). Los productos fueron corridos

en un gel de agarosa al 1,5% durante 90 minutos a 100 voltios y 300 miliamperios. El gel fue teñido con Bromuro de etidio ( $0,5 \mu\text{g/ml}$ ) y visualizado en un transiluminador con luz ultravioleta.

### Recolección y procesamiento de la información

Para el análisis de los niveles de expresión, la intensidad de cada banda fue convertida en valores de densidad óptica (O.D) mediante el software Image J. Con los valores de O.D de cada muestra se construyó una gráfica de barras, con el programa Microsoft Office Excel, en la cual se muestra los niveles de expresión de cada muestra.

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis univariado, para variables cualitativas y proporciones. Para variables cuantitativas se obtuvieron media y desviación estándar. Por otro lado, en el análisis bivariado se utilizó test exacto de Fisher para poner a prueba la asociación entre la presencia del gen y las cepas. El análisis estadístico se realizó en el paquete IBM SPSS Statistics v.20 para Macintosh (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Macintosh, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp).

## RESULTADOS

### Identificación molecular de *E. faecalis*

#### PCR *Enterococcus spp* y *Enterococcus faecalis*

Se realizó una PCR específica del género *Enterococcus*, la cual dio positiva para todas las cepas analizadas (Fig. 1). Adicionalmente, el 100% de las cepas correspondieron a *Enterococcus faecalis*.

#### PCR para detectar la presencia de genes *esp* en las cepas de *E. faecalis*

Los resultados de la presencia del gen de virulencia *esp* en las diferentes cepas se describen en la Tabla 2. De forma global, *esp* estuvo presente en el 37,5% de

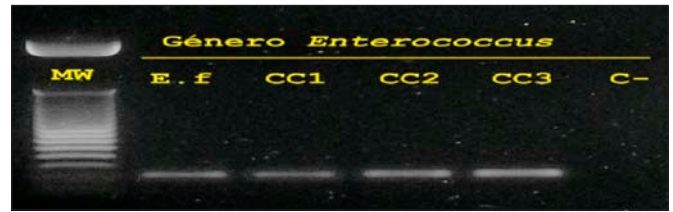


Fig. 1. Pcr género *enterococcus*. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. MW: marcador de peso molecular de 50 pb; E.f: cepa de referencia *E. Faecalis*; CC1: cepa clínica 01; CC2: cepa clínica 02; CC3: cepa clínica 03; C-: control negativo.

las muestras analizadas. Así mismo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la proporción de aparición del gen *esp* (Tabla 3).

TABLA 2.- EXPRESIÓN DEL GEN DE VIRULENCIA *ESP* EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

Cepa	Gen de virulencia <i>Esp</i>
ATCC 29212	+
ATCC 29212	-
CC01	+
CC01	-
CC02	-
CC02	+
CC03	-
CC03	-

TABLA 3.- ANÁLISIS BIVARIADO DE LA OCURRENCIA DEL GEN *ESP* EN LAS MUESTRAS ESTUDIADAS

Cepas	Gen n (%)	Valor p
ATCC 2912 (n=2)	1 (50,0)	0,64
Clínicas (n=6)	2 (33,3)	
Total (n=8)	3 (37,5)	



### Análisis por microscopía de fluorescencia

Los dientes fueron teñidos con el kit de fluorescencia LIVE/DEAD® BacLight® Bacterial Viability y observados al microscopio de fluorescencia con objetivos 5×, 10×, 20×. En los montajes hechos a partir de los dientes inoculados con la cepa de referencia ATCC 29212, se observó la presencia de una multitud de aglomeraciones de bacterias firmemente adheridas a la pared del conducto radicular. Estas agrupaciones de bacterias constituyen las microcolonias formadas por *E. faecalis* durante la formación de biofilm y se pueden evidenciar como cúmulos de color verde ampliamente distribuidos sobre la superficie del conducto (Fig. 2). Por otro lado, en los montajes realizados a partir del diente inoculado con la cepa clínica CC01, no se observó la presencia de agregados de color verde (Fig. 3), lo que significa que esta cepa no fue capaz de formar biofilm.

### Análisis de expresión del gen *esp* mediante RT-PCR

La RT-PCR realizada a partir del ARN extraído de los dientes inoculados con las cepas de *E. faecalis*,

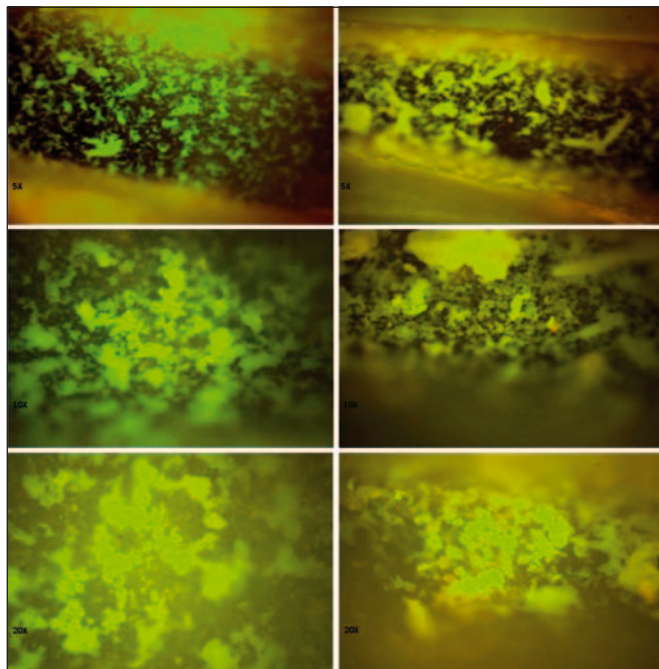


Fig. 2. Formación de biofilm por *E. faecalis*. Microscopía de fluorescencia de secciones 1 y 2 de dientes inoculados con la cepa de referencia ATCC 29212.

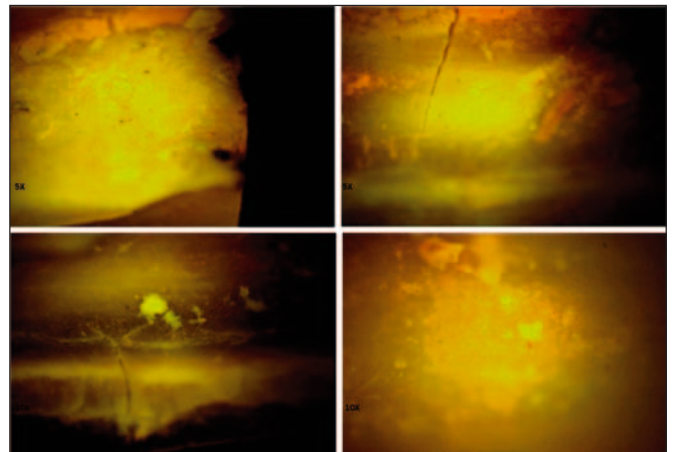


Fig. 3. Ausencia de biofilm. Microscopía de fluorescencia de secciones 1 y 2 de dientes inoculados con la cepa clínica CC01.

permitió cuantificar el nivel de expresión de los genes ARNr 16S y *esp* en las bacterias durante su crecimiento en caldo y formando biofilm en la superficie de los conductos radiculares. La expresión del gen ARNr 16S, usado como gen de referencia en este ensayo, no varió significativamente en las bacterias que crecen en caldo comparadas con las que formaban biofilm. Asimismo, la expresión del gen *esp* en la cepa de referencia ATCC 29212 que creció en suspensión (E.F-S) fue significativamente baja comparado con la expresión del gen de referencia ARNr 16S (Fig. 4).

Por otro lado, la expresión del gen *esp* fue mucho mayor en la cepa CC02 que formaba biofilm (CC02-B) comparado con la misma cepa que creció en suspensión (CC02-S) (Fig. 5). Como se puede observar (Fig. 6 y Tabla 4), el pico de densidad óptica más

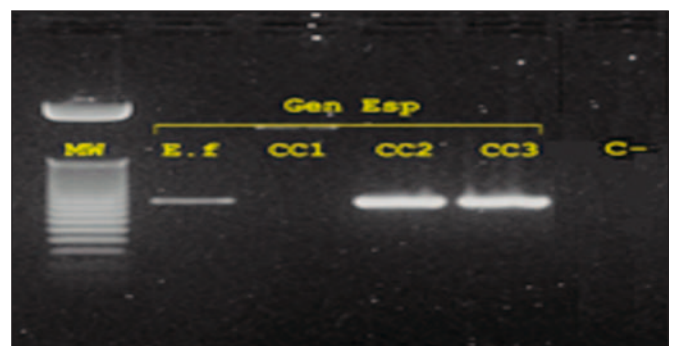


Fig. 4. PCR para detectar la presencia de genes *esp*. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. MW: marcador de peso molecular de 50 pb; E.f: cepa de referencia *E. Faecalis*; CC1: cepa clínica 01; CC2: cepa clínica 02; CC3: cepa clínica 03; C-: control negativo.

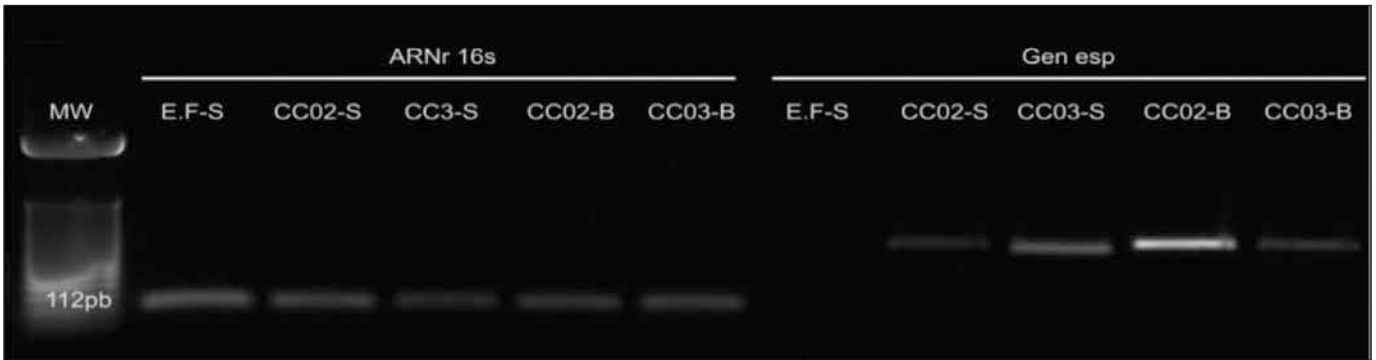


Fig. 5. Análisis de expresión génica mediante RT-PCR. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5%. MW: marcador de peso molecular de 50 pb; E.F-S: cepa de referencia *E. faecalis*, en suspensión; CC2-S: cepa clínica CC02, en suspensión; CC3-s: cepa clínica CC03, en suspensión; CC02-B: cepa clínica CC02, formando biofilm; CC03-B: cepa clínica CC03, formando biofilm.

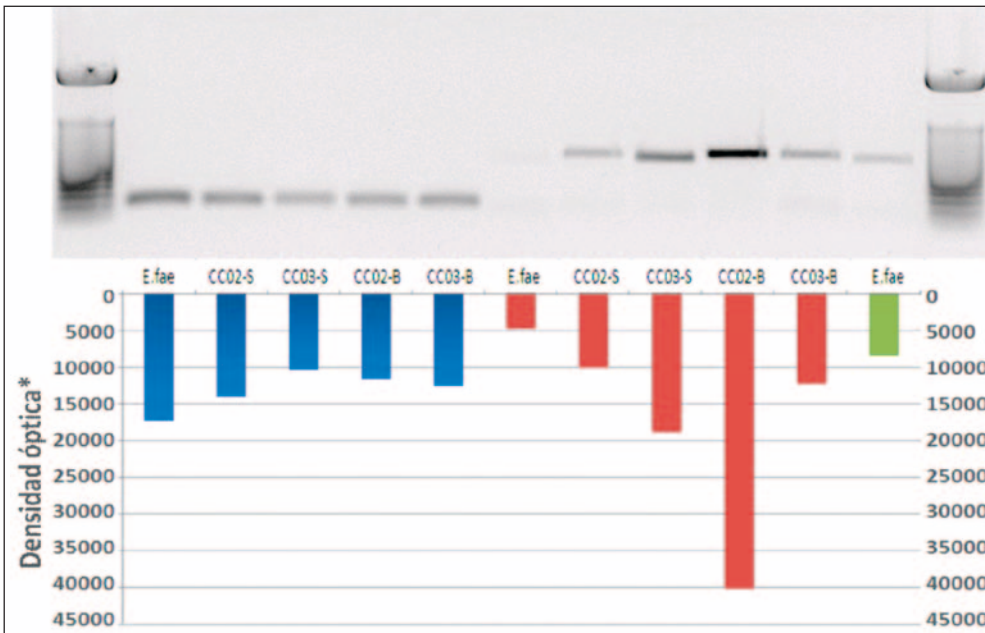


Fig. 6. Gráfica de la densidad óptica de cada banda representada como barras.

\* El valor de cada barra está dado por la intensidad promedio de cada pixel dividido por el área de cada banda.

alto, corresponde a la mayor expresión del gen *esp* en la cepa CC02 cuando creció formando biofilm, mientras que para el gen ARNr 16S no hubo diferencia en la altura de los picos correspondientes a las cepas y sus respectivos tratamientos.

## DISCUSIÓN

El biofilm se define como comunidades bacterianas adheridas a una superficie y encerradas en una matriz extracelular que favorece su resistencia a agentes externos. Recientemente el término de biofilm bacteriano, ha ganado importancia clínica debido a que

propicia la resistencia a los agentes antibacterianos más utilizados en odontología (7). El primer paso en la formación de biofilm es la unión de bacterias a una superficie ya sea inerte, como ocurre en los dispositivos médicos implantados dentro del organismo, o en superficies propias del huésped como es el caso de válvulas cardíacas, pulmón e incluso sobre el esmalte dentario. Los pasos subsiguientes para el desarrollo del biofilm incluyen la producción de la matriz extracelular y el crecimiento y maduración de la misma (8).

El género *Enterococcus* se asocia frecuentemente con la formación de biofilm en diversos dispositivos médicos permanentes tales como: válvulas protésicas del

**TABLA 4.- RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ESP* EN CEPAS CLÍNICAS Y ATCC (REFERENCIA)**

Cepas	Cantidad
ATCC 2912 (n=2)	1,60
Clínicas (n=6)	2,90
Promedio	2,25

corazón, dispositivos intrauterinos, prótesis de cadera artificiales, catéteres urinarios y venosos centrales (7). Las dos especies más comunes son: *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. Durante el proceso de formación del biofilm de esta especie bacteriana se han reportado diversas dianas moleculares asociados tales como los genes *fsr*, *bpd*, *esp* y *gel e* presentes tanto en *E. faecalis* y *E. faecium* (9-13).

La formación de biofilm es un proceso de desarrollo complejo de fijación e inmovilización sobre una superficie: interacción célula a célula, formación de microcolonias, formación de biofilm confluyente y el desarrollo de una estructura tridimensional del biofilm (14). Sin embargo, la red de regulación, así como el papel preciso que cada uno de los factores identificados, no se ha esclarecido totalmente en el proceso de formación del biofilm y los resultados parecen ser contradictorios. Para tratar de recrear este proceso complejo, en el presente estudio se diseñó un sistema *in vitro* que permitió evaluar la formación de biofilm de *E. faecalis* mediante microscopía de fluorescencia y la evaluación de una diana molecular de gran discusión actual, el gen *esp*, el cual se ha reportado asociado al proceso de formación de biofilm de *E. faecalis* (15). El modelo *in vitro* de formación de biofilm de *E. faecalis*, consistió en dientes humanos extraídos, con instrumentación endodóntica y acondicionado a un sistema de anaerobiosis artificial, todo esto con la finalidad de recrear las condiciones de un conducto radicular posterior al tratamiento endodóntico, con fracaso del mismo. La regulación de la expresión génica bacteriana en respuesta a la densidad de la población de células, quórum sensing, se logra a través de la producción de moléculas de señalización extracelular llamada

autoinductores (Miller y Bassler, 2001). La producción de biofilm está regulada por sistemas de detección de quórum sensing en varios patógenos bacterianos. El biofilm es notoriamente difícil de erradicar y es una fuente de muchas infecciones crónicas (16).

Un biofilm maduro puede tolerar antibióticos a concentraciones de 10-1000 veces más que las requeridas para matar a las bacterias planctónicas. Toledo-Arana y cols. informaron que la capacidad para formar biofilm es común entre los aislados clínicos de *E. faecalis*. La capacidad de formación de biofilm se limita a las cepas que albergan el gen *esp*, el cual promueve la unión primaria y la formación de biofilm por *E. faecalis* en superficies abióticas (6). Los resultados observados en el presente estudio evidenciaron que las muestras clínicas expresaron *esp* en un 33,3% de las muestras. Sin embargo, Dworniczek et al y Mohamed et al encontraron que el gen *esp* no era necesario para la formación del biofilm (17). Otro estudio realizado por Kristich et al demostró la formación *in vitro* de biofilm por *E. faecalis* en ausencia del gen *esp* y la patogenicidad de la secuencia de codificación (12). Los resultados indican que la presencia del gen *esp* no es necesaria y suficiente para la producción de biofilm en *Enterococcus*. En una investigación realizada por Ramadhan y Hegedus demostraron que la presencia del gen *esp* no es necesaria ni suficiente para la producción de biofilm en los *Enterococcus* y que el suero humano puede ser un medio más sensible que caldo BHI para demostrar la formación de biofilm en los *Enterococcus* (18).

En el presente estudio, se demostró que tanto cepas wild type como de referencia, tienen el potencial de expresar el gen *esp*. Sin embargo, no todas expresan este factor de virulencia. La literatura demuestra resultados contradictorios respecto a la función del gen *esp* en biofilm en formación. Toledo-Arana y sus colegas informaron que el 93,5% de *E. faecalis esp<sup>+/+</sup>* aislados forman biofilm en una superficie abiótica y ninguno de los *E. faecalis esp<sup>-/-</sup>* aislados producen biofilm. Sugieren que *esp* promueve la formación de biofilm, sin embargo, ciertos determinantes adicionales pueden contribuir a la formación de biofilm en *E. faecalis* (6). El *esp* se ha asociado con una mejora en la adherencia a las superficies abióticas y la formación de biofilm de *E. faecalis*, especialmente en la presencia de 0,5% (wt/vol) de glucosa (6,19).



La expresión de *esp* promueve una fuerte interacción entre el sustrato y las bacterias, dando lugar a un mayor número de bacterias adheridas (20).

Mohamed et al, en el 2004, realizaron un estudio clínico de *enterococcus*, en el cual todas las cepas *esp*<sup>+/+</sup> (74) produjeron biofilm y 77 de 89 cepas *esp*<sup>-/-</sup> también produjeron biofilm. Entre las cepas de *enterococcus* productoras de biofilm, el 69% produjeron biofilm fuerte, el 46% medianamente fuertes y el 30% fueron productores débiles de biofilm; ninguna de las 12 cepas no productoras de biofilm fueron *esp* positivas ( $p < 0,001$ ). Los autores concluyeron que *esp* no se requiere para la producción de biofilm, pero existe una fuerte asociación entre la presencia del gen *esp* y mayores niveles de producción de biofilm en *E. faecalis* (21). Otros estudios sugieren que este gen no parece ser necesario ni suficiente para la producción de biofilm en *E. faecalis* y *E. faecium*. Di Rosa y cols. (2006) también han demostrado que *E. faecalis* (36 de 83) y *E. faecium* (9 sobre 45) *esp*-positivos aislados no estaban asociados con la formación de biofilm. Sin embargo, estos autores informaron que algunas cepas *esp*-positivos producen biofilm más denso que los productores de biofilm *esp*-negativos (15). Los factores exactos, incluyendo *esp*, y mecanismos implicados en la producción de biofilm por *enterococcus* aún se desconocen y son un área de investigación activa. Giridhara P M y cols., en 2011, demostraron que el gen *esp* y la formación de biofilm son importantes factores para que *E. faecalis* pueda colonizar y causar infecciones nosocomiales asociadas a dispositivos médicos implantados. Además, las cepas no formadoras de biofilm pueden convertirse a un fenotipo formador de biofilm si se transforma en una cepa *esp* positiva. Se demostró que una proteína similar al *esp* en los estafilococos media la formación del biofilm, indicando que esta característica está ampliamente distribuida entre los organismos que causan infecciones nosocomiales relacionadas con dispositivos médicos implantados. El sistema que se diseñó en este estudio funciona para la expresión del gen el cual dio como resultado el biofilm en el estudio de la fluorescencia y PCR. Se comparó la cepa de referencia con las cepas clínicas y se encontró la expresión del gen *esp* con la aplicación de pruebas moleculares que determinan la sobreexpresión de estos genes cuando las bacterias crecen en biofilm.

## CONCLUSIONES

La presencia y expresión del gen *esp* podría estar asociado con la formación de biofilm en *E. faecalis*. El gen *esp* es sobre expresado por la bacteria cuando se encuentra en estado de formación de biofilm. Se diseñó un modelo de expresión génica de bacterias formando biofilm, permitiendo la comprensión de la función de factores genéticos a través del análisis *in vitro* de la expresión de los genes asociados a la formación de biofilm, que pueden conducir a mejores estrategias para su control.

## LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES DEL ESTUDIO

Se requiere adaptar el sistema a un tubo recolector para recuperar de manera óptima el lisado celular durante la extracción del ARN con el reactivo QIAzol. Segundo, durante el corte de los dientes para la tinción con fluorescencia, es necesario realizar cortes más finos que permitan acercar más el objetivo del microscopio a la muestra, ya que esto permitiría utilizar objetivos de mayor resolución como 40× y 100×. Por último, el análisis de la expresión génica puede ser optimizado mediante PCR cuantitativa en tiempo real. Una de las principales limitaciones fue el número de réplicas, es decir, el número de dientes utilizados, ya que esto impidió realizar la verificación de los resultados obtenidos para cada cepa bacteriana. Para futuros ensayos recomendamos ampliar el número de réplicas así como el de cepas clínicas y genes a estudiar.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Czarán T, Hoekstra RF. Microbial communication, cooperation and cheating: quorum sensing drives the evolution of cooperation in bacteria. *PloS one* 2009; 4(8):e6655. PubMed PMID: 19684853. Pubmed Central PMCID: 2722019.
2. Nowak M, Kurnatowski P. Biofilm caused by fungi-structure, quorum sensing, morphogenetic changes, resistance to drugs. *Wiadomosci parazytologiczne* 2009;55(1):19-25. PubMed PMID: 19579780. Biofilm tworzony przez grzyby-struktura, quorum sensing, zmiany morfogenetyczne, opornosc na leki.

3. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999;May 21;284(5418):1318-22. PubMed PMID: 10334980.
4. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of endodontics*. 2002 Oct;28(10):689-93. PubMed PMID: 12398165.
5. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics* 2006;Feb;32(2):93-8. PubMed PMID: 16427453.
6. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* 2001;Oct;67(10):4538-45. PubMed PMID: 11571153. Pubmed Central PMCID: 93200.
7. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases* 2002;Sep;8(9):881-90. PubMed PMID: 12194761. Pubmed Central PMCID: 2732559.
8. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2001;Oct 15;33(8):1387-92. PubMed PMID: 11565080.
9. Hufnagel M, Koch S, Creti R, Baldassarri L, Huebner J. A putative sugar-binding transcriptional regulator in a novel gene locus in *Enterococcus faecalis* contributes to production of biofilm and prolonged bacteremia in mice. *The Journal of infectious diseases* 2004;Feb 1;189(3):420-30. PubMed PMID: 14745699.
10. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. The N-terminal domain of enterococcal surface protein, Esp, is sufficient for Esp-mediated biofilm enhancement in *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* 2005; Sep;187(17):6213-22. PubMed PMID: 16109963. Pubmed Central PMCID: 1196143.
11. Hancock LE, Perego M. The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *Journal of bacteriology* 2004;Sep;186(17):5629-39. PubMed PMID: 15317767. Pubmed Central PMCID: 516840.
12. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* 2004;Jan;186(1):154-63. PubMed PMID: 14679235. Pubmed Central PMCID: 365672.
13. Pillai SK, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Moellering RC, Jr., Murray BE, Inouye RT. Effects of glucose on *fsr*-mediated biofilm formation in *Enterococcus faecalis*. *The Journal of infectious diseases* 2004;Sep 1;190(5):967-70. PubMed PMID: 15295702.
14. O'Toole G, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology* 2000;54:49-79. PubMed PMID: 11018124.
15. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, et al. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. *FEMS microbiology letters* 2006;Mar;256(1):145-50. PubMed PMID: 16487332.
16. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annual review of microbiology* 2001;55:165-99. PubMed PMID: 11544353.
17. Dworniczek E, Kuzko K, Mroz E, Wojciech L, Adamski R, Sobieszczanska B, et al. Virulence factors and in vitro adherence of *Enterococcus* strains to urinary catheters. *Folia microbiologica* 2003;48(5):671-8. PubMed PMID: 14976727.
18. Ramadhan AA, Hegedus E. Biofilm formation and esp gene carriage in enterococci. *Journal of clinical pathology* 2005;Jul;58(7):685-6. PubMed PMID: 15976332. Pubmed Central PMCID: 1770729.
19. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Gilmore MS, Shankar N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity* 2004;Oct;72(10):6032-9. PubMed PMID: 15385507. Pubmed Central PMCID: 517584.
20. Waar K, van der Mei HC, Harmsen HJ, Degener JE, Busscher HJ. *Enterococcus faecalis* surface proteins determine its adhesion mechanism to bile drain materials. *Microbiology* 2002 Jun;148(Pt 6):1863-70. PubMed PMID: 12055306.
21. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity* 2004;Jun;72(6):3658-63. PubMed PMID: 15155680. Pubmed Central PMCID: 415661.

## CORRESPONDENCIA

Eduardo Covo Morales  
 Facultad de Odontología. Universidad de Cartagena  
 Campus de la Salud  
 Correo electrónico: ecovom@unicartagena.edu.co