



TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

Papel de la persistencia bacteriana en el fracaso terapéutico con antibióticos

Amanda Medina Guerra

Tutor: Eduardo Pérez Roth

Co-tutora: Julia Alcoba Florez

Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y
Genética

Índice

Resumen	2
Abstract	2
1. Introducción	3
1.1. Persistencia y resistencia	4
1.2. Persistencia y tolerancia	6
1.3. Tipos de persistencia	6
2. Objetivos	7
3. Metodología	8
4. Resultados y discusión	9
4.1. ¿Es la latencia suficiente para que se produzca la persistencia?	9
4.2. Principales mecanismos implicados en la formación de las células persistentes	11
4.2.1. Módulos toxina-antitoxina (TA)	11
4.2.2. Guanosina tetrafosfato y pentafosfato (ppGpp)	11
4.2.3. Respuesta SOS	12
4.2.4. Detección de <i>quorum</i>	13
4.2.5. Formación de biopelículas	14
4.3. Relación entre persistencia y resistencia	15
4.4. Principales estrategias de lucha contra la persistencia	16
4.4.1. Activación del metabolismo de las células persistentes	16
4.4.2. Utilización de potenciadores de los agentes antibacterianos	17
4.4.3. Incrementar la entrada del antibiótico en la bacteria	18
5. Conclusiones	20
6. Bibliografía	21

Resumen

El fracaso del tratamiento con antibióticos de infecciones causadas por bacterias patógenas no se debe exclusivamente al desarrollo de resistencia a los mismos, sino también puede deberse a la persistencia y tolerancia. Las células persistentes pueden sobrevivir al tratamiento con antibióticos debido a que sufren modificaciones en su metabolismo que les hacen poseer tolerancia a los mismos. En este trabajo se llevó a cabo una revisión bibliográfica con el objetivo de comprender cómo se genera la persistencia, conocer su relación con la resistencia, así como las posibles nuevas estrategias que se están estudiando para erradicar a las células persistentes. Entre los mecanismos que se han asociado con la persistencia bacteriana destacan los módulos toxina-antitoxina, la señalización a través de pentafofato/tetrafofato de guanosa (ppGpp), la comunicación bacteriana mediante la señal de *quorum*, el sistema de reparación de emergencia (respuesta SOS) y la formación de biopelículas. Además, son especialmente preocupantes los hallazgos de la relación entre la persistencia y la resistencia. Finalmente, la investigación para luchar contra la persistencia incluye varias aproximaciones que, aunque se encuentran en fases muy iniciales de investigación, tienen un futuro prometedor.

Abstract

The failure of antibiotic treatment of infections caused by pathogenic bacteria is not exclusively due to the development of resistance to them, but may also be due to persistence and tolerance. Persistent cells can survive treatment with antibiotics because they undergo changes in their metabolism that make them have tolerance to them. In this work, a bibliographic review was carried out in order to understand how persistence is generated, to know its relationship with resistance, as well as the possible new strategies that are being studied to eradicate persistent cells. Mechanisms that have been associated with bacterial persistence include toxin-antitoxin modules, guanosine pentaphosphate/tetraphosphate (ppGpp) signaling, bacterial communication via quorum signal, emergency repair system (SOS response) and the formation of biofilms. In addition, the findings of the relationship between persistence and resistance are of particular concern. Finally, research to combat persistence includes several approaches that, although they are in very early stages of research, have a promising future.

1. Introducción

La persistencia bacteriana es un fenómeno que ocurre en una subpoblación de bacterias cuando estas son sometidas a un tratamiento antibiótico, de forma que son capaces de sobrevivir (1). Es un proceso relacionado con una curva de muerte bifásica (Figura 1), el cual se produce por la existencia de una población heterogénea donde hay una subpoblación de células persistentes que mueren lentamente, mientras que la otra parte de la población es susceptible al antibiótico y muere rápidamente (2, 3).

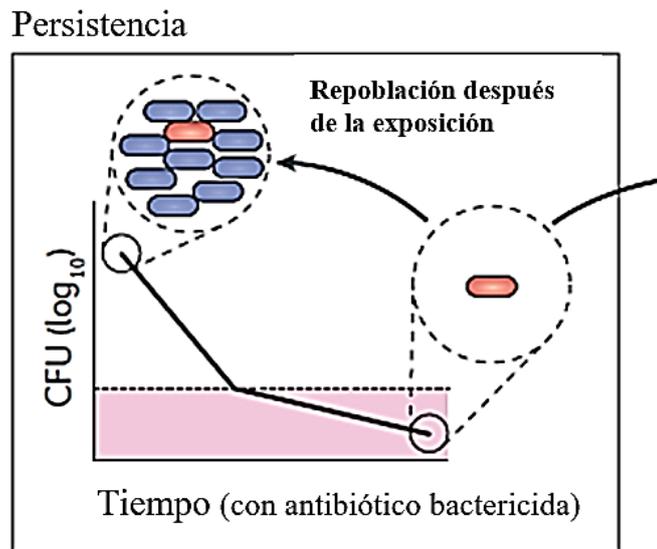


Figura 1. Curva de muerte bifásica. Se produce una muerte bifásica, en la que la subpoblación susceptible (azul) muere rápidamente, mientras que la población persistente (rojo) muere de forma más lenta. Modificado de (2).

Las bacterias adquieren esta capacidad debido a que se induce un estado metabólico latente o reducido, de manera que las dianas de los antibióticos están inactivas y les permite escapar de su acción. Por tanto, ya que los antibióticos necesitan dianas activas para poder actuar, las células persistentes no se verían afectadas si se utiliza una concentración de antibiótico equivalente a la concentración mínima inhibitoria (CMI), que normalmente inhibiría el crecimiento de las bacterias (1, 2, 3, 4).

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que muchas infecciones recurrentes se asocian con la persistencia. Por ejemplo, es el caso de las infecciones por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, de *Escherichia coli* causante de infecciones del tracto urinario y de *Mycobacterium tuberculosis* en la tuberculosis (4).

1.1. Persistencia y resistencia

La persistencia es un fenómeno similar a la resistencia bacteriana, en el sentido de que ambas otorgan a las bacterias la capacidad de sobrevivir al tratamiento antibiótico. En concreto, la resistencia es la capacidad de una bacteria para sobrevivir y replicarse en presencia de un antibiótico, y ésta se puede adquirir mediante transferencia genética horizontal (HGT) o por mutaciones en el cromosoma bacteriano (3).

Sin embargo, entre persistencia y resistencia existen diferencias importantes:

- La resistencia permite a las bacterias sobrevivir a los antibióticos, pero también replicarse en presencia de los mismos. En el caso de las bacterias persistentes, estas no tienen capacidad de replicarse en contacto con el antibiótico, sino que se encuentran latentes.
- La resistencia se hereda, por lo que las células hijas también serán resistentes al antibiótico. Sin embargo, la persistencia no se hereda, de manera que las células que crecen tras eliminar el antibiótico son susceptibles al mismo (Figura 2) (2,3).

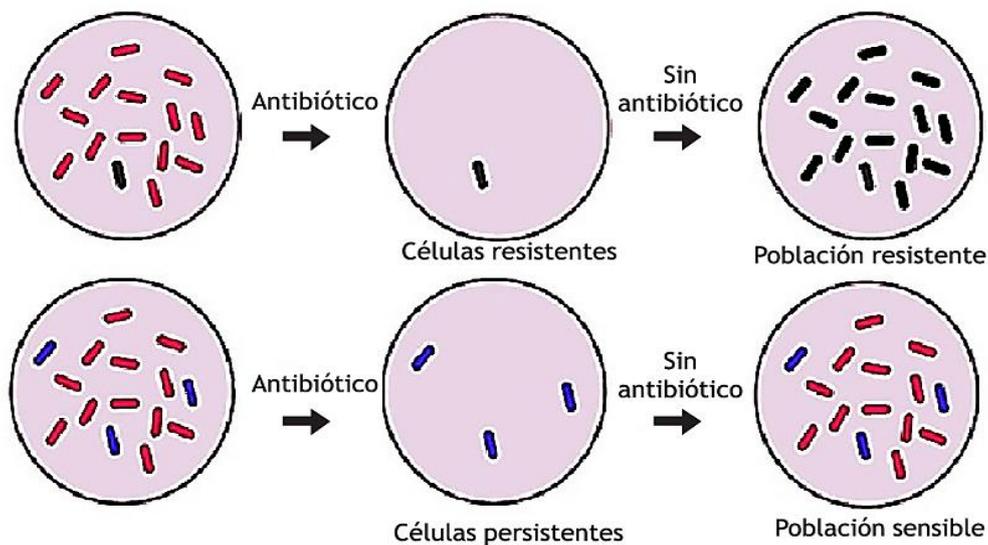


Figura 2. Comparación entre persistencia y resistencia. En la parte superior de la imagen se observa que cuando existen algunas células resistentes al antibiótico, al eliminar el tratamiento con este, las células que vuelven a repoblar la zona de la infección son igualmente resistentes debido a su capacidad hereditaria, resultando así en una población completamente resistente. Por otro lado, en la parte inferior se observa que cuando existe persistencia, la población que crece después de retirar el tratamiento con antibióticos será sensible al mismo, ya que la persistencia no se hereda a las células hijas (1).

A pesar de sus diferencias, ambos fenómenos están íntimamente relacionados. Recientemente se ha descubierto que las células persistentes pueden promover la propagación de genes de resistencia a antibióticos por medio de la HGT. Además, los niveles de persistencia se relacionan con las tasas de mutación, de forma que las poblaciones con mayores niveles de persistencia mutan más fácilmente, pudiendo generar de esta manera células resistentes (Figura 3) (2).

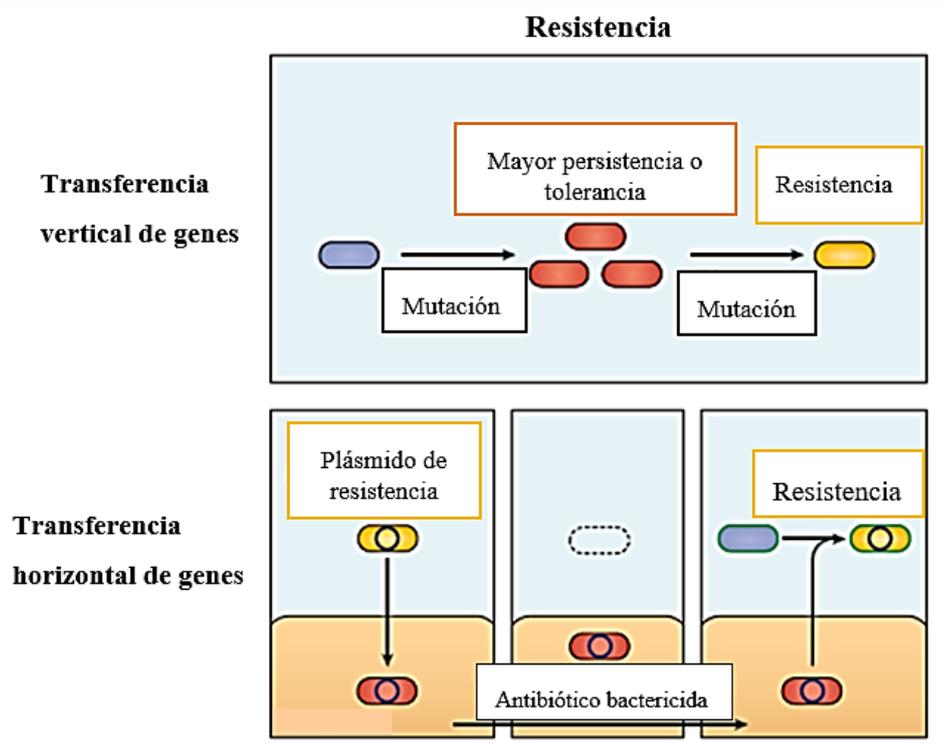


Figura 3. Contribución de la persistencia a la resistencia. Las células persistentes (rojos) pueden impulsar la evolución de la resistencia. A nivel cromosómico (transferencia vertical de genes), las células persistentes aumentan la probabilidad de que se produzcan mutaciones que conducen a la resistencia. A nivel de elementos genéticos móviles (transferencia horizontal de genes), las células persistentes forman reservorios que pueden almacenar plásmidos de resistencia a antibióticos, que se pueden donar a otras células (contorno verde) después del tratamiento con antibióticos. Las bacterias susceptibles a los antibióticos se muestran en azul, las persistentes en rojo, las resistentes en amarillo y las muertas con líneas discontinuas; los elementos móviles se representan como círculos negros. Modificado de (2).

1.2. Persistencia y tolerancia

La persistencia también es un mecanismo muy similar a la tolerancia, la cual se define como la habilidad de las bacterias para sobrevivir a concentraciones de antibiótico por encima de la CMI, sin poseer un mecanismo de resistencia (3). Podríamos considerar a la persistencia como “heterotolerancia”, ya que los mecanismos implicados en la tolerancia, como son la latencia, la disminución del metabolismo y los niveles de ATP también se han identificado en la persistencia. Sin embargo, mientras que la tolerancia aparece en toda la población bacteriana, la persistencia lo hace solo en una pequeña parte de dicha población (3).

1.3. Tipos de persistencia

Según el mecanismo por el que se generan las células persistentes se pueden distinguir (Figura 4):

- Persistencia desencadenada: se da con más frecuencia. Se genera debido a un desencadenante externo, que normalmente es la falta de nutrientes, aunque también podría haber otras causas, como la presencia de antibióticos. Estas células persistentes se forman tras la fase estacionaria y no pueden volver al fenotipo sensible (1, 3).
- Persistencia espontánea: se trata de células persistentes de crecimiento lento, produciéndose sin ninguna señal externa. Estas se generan cuando la población se encuentra en fase exponencial, y pueden volver al fenotipo sensible (1, 2, 3).

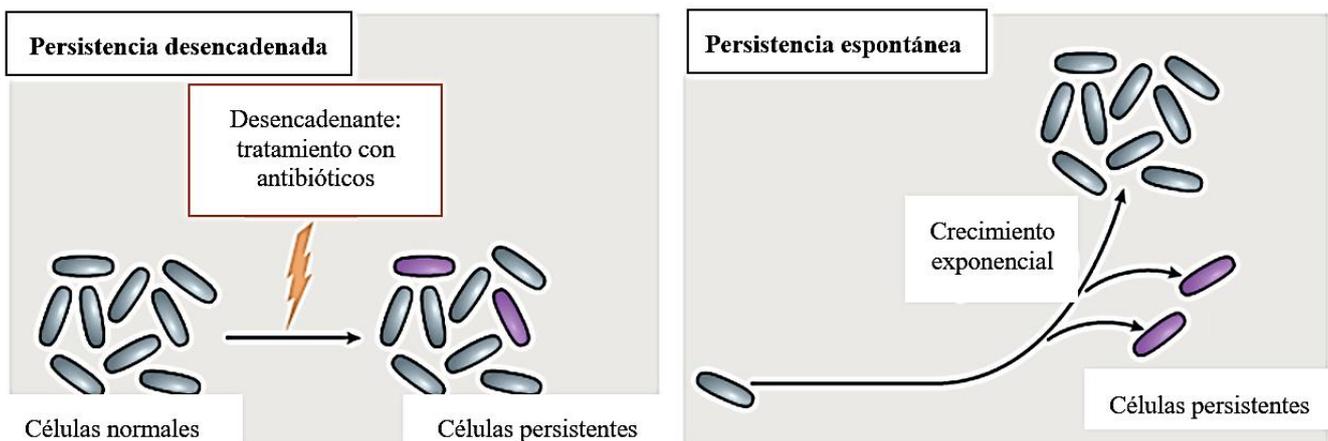


Figura 4. Tipos de persistencia. La persistencia desencadenada requiere un factor externo para que las bacterias se conviertan en persistentes (izquierda). La persistencia espontánea no necesita un desencadenante externo para producirse, sino que se produce estocásticamente. Modificado de (2).

2. Objetivos

Los objetivos de este trabajo son los siguientes:

- 1.** Conocer los principales mecanismos que llevan a la formación de células persistentes.
- 2.** Determinar si el estado de latencia es suficiente para que se produzca la persistencia.
- 3.** Establecer el alcance de la relación entre la persistencia y la resistencia bacteriana
- 4.** Describir las principales estrategias que se están investigando para luchar contra las bacterias persistentes

3. Metodología

La principal fuente de información utilizada fue la base de datos de acceso libre MEDLINE, empleando como motor de búsqueda Pubmed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>).

La búsqueda inicial se realizó utilizando las palabras clave “antibiotic and bacterial persistence”, acotando la búsqueda con ciertos parámetros, como artículos de menos de 10 años y disponibilidad del texto completo. De esta manera se obtuvieron 288 resultados, entre los cuáles se descartaron las revisiones en la elaboración del apartado “resultados y discusión”, aunque estas sí fueron empleadas en la introducción. También se descartaron artículos cuya información no se relacionaba con los objetivos de este trabajo.

Además, para completar la búsqueda se utilizaron otras combinaciones de palabras clave, como son las siguientes: “bacterial persistence and antibiotic resistance”, “toxin-antitoxin modules”, “SOS system”, “quorum sensing”, entre otras. La mayor parte del contenido de este trabajo se obtuvo del análisis de 27 artículos científicos.

4. Resultados y discusión

4.1. ¿Es la latencia suficiente para que se produzca la persistencia?

La persistencia se asocia habitualmente con un metabolismo latente, y muchos estudios han demostrado la veracidad de este hecho, ya que la falta de replicación o una baja actividad metabólica antes del tratamiento con antibióticos aumenta la probabilidad de que una célula sea persistente (5, 6). Sin embargo, esto puede no ser suficiente para garantizar que se produzca la persistencia, ya que la mayoría de las subpoblaciones, incluso encontrándose "inactivas", no producen células persistentes. Esto sugiere que la persistencia es un proceso complejo, y que existen características adicionales que se relacionan con el fenotipo persistente (5).

Según algunos estudios, las células que se replican de manera normal también pueden generar persistencia. En el trabajo de Orman (5), utilizando la técnica de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS, del inglés *Fluorescence-Activated Cell Sorting*) aplicada a un cultivo de *E. coli* en fase exponencial, se observó que la subpoblación no replicante estaba mucho más enriquecida en células persistentes (1%) que la subpoblación en crecimiento (0,01%). Sin embargo, teniendo en cuenta la abundancia relativa de las subpoblaciones en crecimiento y en no crecimiento, concluyeron que el 20% de todas las células persistentes se originaron en células en crecimiento. Por tanto, aunque la latencia puede aumentar la probabilidad de que existan células persistentes, las células replicantes también pueden dar lugar a persistencia.

Por otra parte, se ha demostrado que en la formación de células persistentes pueden intervenir otros elementos. Entre ellos se encuentran las bombas de eflujo (Figura 5), cuya función es bombear activamente los antibióticos hacia afuera de la célula para reducir su acumulación. También, la modificación de la permeabilidad de la membrana plasmática, de manera que, si esta disminuye, se reduce la entrada de algunos antibióticos (6). En un estudio interesante (6), para investigar la acumulación de antibióticos en las células persistentes, se utilizó un antibiótico β -lactámico fluorescente, BOCILLIN™ FL Penicilina (BOCILINA), para medir cuantitativamente la concentración intracelular del fármaco en células individuales. Se encontró que la intensidad de la fluorescencia promedio en las células persistentes fue solo 1/5 la de las células totales, lo que indica que la concentración del antibiótico acumulada fue menor en las células persistentes. Asimismo, para comprobar

la participación de las bombas de eflujo y de las porinas en la persistencia, se construyeron dos porinas mutantes (DompF y DompC) y una bomba de eflujo mutante (DtolC), en ambos casos inhabilitadas. En el caso de las dos porinas, se observó una disminución de 4 veces en la intensidad de la fluorescencia en comparación con el total de las células, mientras que, para la bomba de eflujo, la fluorescencia aumentó en su intensidad en comparación con el valor obtenido para el tipo salvaje. Por consiguiente, las porinas inhabilitadas dieron lugar a una reducción en la entrada del antibiótico a la célula, ya que disminuyó la permeabilidad de la membrana plasmática; por su parte, la bomba inhabilitada aumentó la concentración intracelular del fármaco, ya que se redujo la acción de eflujo, de manera que no se expulsaba el antibiótico hacia el exterior y había una mayor acumulación del mismo (6).

Estos hallazgos demuestran que la persistencia, además de ser una defensa pasiva mediante la inactividad, también puede funcionar como una defensa activa contra los antibióticos, como lo demuestra la acción de las bombas de eflujo (4, 5, 6).

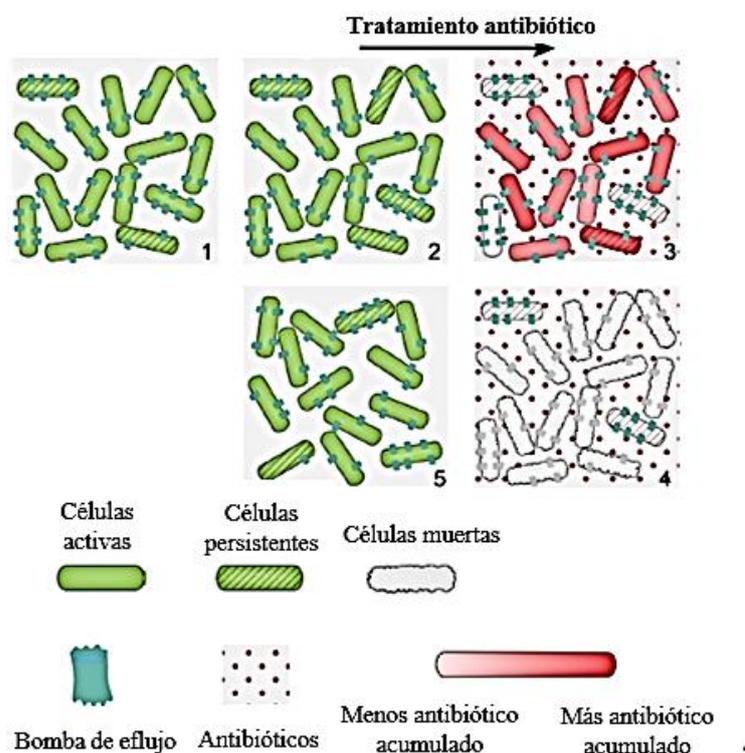


Figura 5. Bombas de eflujo. Se puede observar que las células persistentes poseen un mayor número de bombas de eflujo en su superficie, por lo que, al iniciar un tratamiento antibiótico, estas van a acumular menor cantidad de antibiótico en su interior, de forma que van a estar protegidas de su acción y van a permitir repoblar la población bacteriana. Modificado de (6).

4.2. Principales mecanismos implicados en la formación de las células persistentes.

4.2.1. Módulos toxina-antitoxina (TA)

Los módulos TA son conjuntos de dos o más genes unidos que codifican dos componentes: una toxina estable (que siempre es una proteína) que puede interrumpir las vías celulares esenciales e inducir un estado de letargo, y una antitoxina lábil (que puede ser una proteína o ARN), que se puede conjugar con la toxina para anular su toxicidad (6).

Estos módulos TA se clasifican en diferentes tipos: en los tipos II, IV y V, ambos genes de toxina y antitoxina codifican una proteína, mientras que el gen de la antitoxina en los tipos I y III codifica para un ARN antisentido (7). De estos, el más común es el tipo II, que a su vez se clasifica en diferentes familias en función de la homología de su secuencia (8, 9).

Estos módulos inducen una acción celular durante circunstancias desfavorables, conduciendo a la inhibición de procesos celulares fundamentales, como la transcripción, la traducción y la replicación del ADN, de manera que al inhibir estos procesos se induce el estado latente que está implicado en la persistencia (7).

4.2.2. Guanosina tetrafosfato y pentafosfato (ppGpp)

El análogo de nucleótido ppGpp es un segundo mensajero que se activa en respuesta al estrés, fundamentalmente cuando hay déficit de aminoácidos o ácidos grasos, e inhibe la ADN primasa y la síntesis de ARNr, afectando así al proceso de traducción. También está relacionado con la patogénesis bacteriana, pudiendo generar tolerancia y persistencia (10).

La formación de células persistentes puede deberse a la heterogeneidad en los niveles de ppGpp en la población bacteriana (11). Las bacterias que contienen altos niveles de ppGpp son capaces de inhibir la enzima polifosfato hidrolasa (PPX), lo que conduce a la acumulación de polifosfato inorgánico (polyP) en la célula, el cual es sintetizado por la polifosfato quinasa (PPK). La acumulación de polyP estimula a la proteasa Lon para degradar las antitoxinas del módulo TA, activando así las toxinas (10, 11). De esta forma, las toxinas inducen un estado latente y promueven la persistencia. Por tanto, ppGpp ha llegado a ser considerado como el “maestro regulador” de la generación de la persistencia (10, 12).

4.2.3. Respuesta SOS

La respuesta SOS es un sistema de reparación que se activa cuando se produce daño en el ADN, permitiendo su reparación. Las proteínas que componen el sistema de genes SOS incluyen un represor transcripcional (LexA) y una proteína activadora de unión al ADN (RecA) (13).

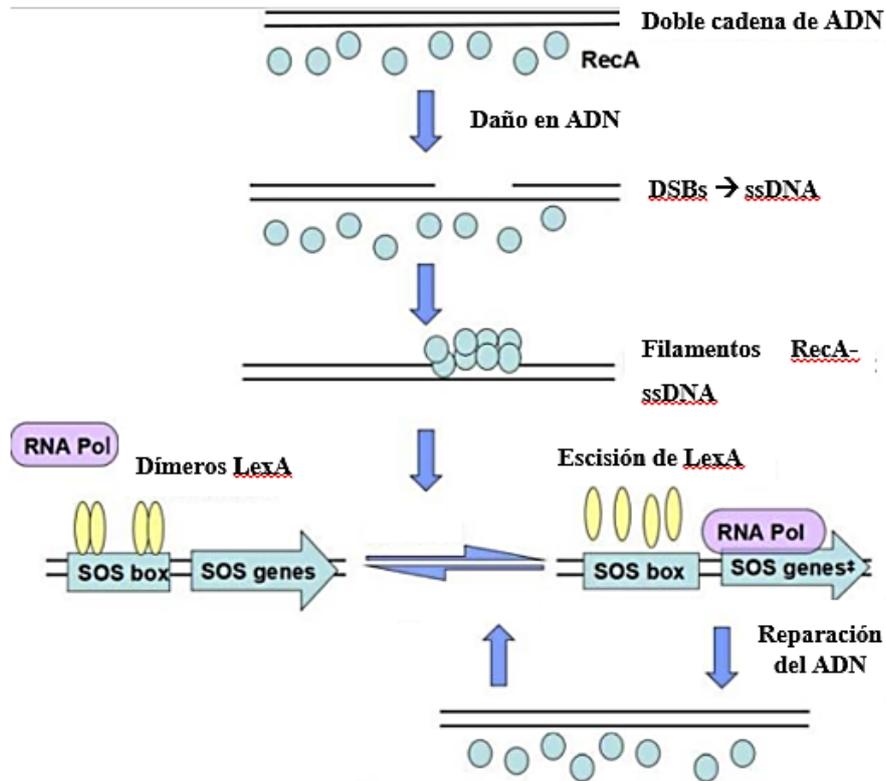


Figura 6. Proceso de inducción SOS. En una situación normal, el represor LexA se une a la caja SOS, formando un dímero. Cuando se producen lesiones de ADN, se genera ADN de una sola hebra (ssDNA) a partir de roturas de la doble hebra. Se forman también filamentos de RecA, que se unen al ADN monocatenario, dando lugar a filamentos RecA-ssDNA, que a su vez se unen a la doble cadena de ADN en una región complementaria, activándose así el RecA. Finalmente se induce la escisión autocatalítica de LexA, lo que permite la expresión de genes SOS. Cuando se completa el trabajo de reparación, la respuesta SOS se revierte debido a la desaparición de los filamentos RecA, y los dímeros LexA recién sintetizados se unen a la caja SOS. Modificado de (14).

Un estudio reciente ha demostrado que la persistencia de *E. coli* a las fluorquinolonas (FQ) depende de esta respuesta SOS. Tras la unión de FQ a la bacteria, las enzimas diana ADN girasa y topoisomerasa IV actúan como endonucleasas, generando roturas en la doble hebra del cromosoma bacteriano. Cuando esto ocurre, RecA cataliza la unión de una hebra de ADN monocatenario (ssDNA) y una región complementaria de la

doble hebra del ADN; en el filamento de nucleoproteína RecA-ssDNA, RecA se estimula la escisión autocatalítica del represor LexA, activando la respuesta SOS y reparando los daños producidos por el antibiótico, disminuyendo de esta manera su efectividad (Figura 6) (13).

4.2.4. Detección de *quorum*

La detección de quorum o red de comunicación bacteriana actúa como un mecanismo de adaptación ambiental, ya que permite a las células modificar su comportamiento colectivo debido a cambios en la densidad de la población gracias a la producción y detección de moléculas de señalización, llamadas autoinductores (15).

El autoinductor 2 (AI-2) está relacionado con la persistencia, y es producido por la enzima LuxS, que convierte la S-ribosilhomocisteína en 4,5-dihidroxi-2,3-pentanodiona (DPD). El DPD es inestable y se cicla espontáneamente para formar un diéster de borato de furanosilo (molécula de AI-2) (Figura 7) (16, 17, 19). A medida que aumenta la densidad de bacterias, y una vez que se alcanza un nivel umbral crítico extracelular de AI-2, se activa una señal de transducción en cascada, que da lugar a una expresión poblacional de genes diana y alteraciones fisiológicas en las bacterias relacionadas con la virulencia, secreción de proteínas, producción extracelular de polisacáridos y formación de biopelículas (15). De esta manera, se favorece la formación de células persistentes en función de los cambios que se producen en el entorno, como puede ser la presencia de antibióticos (16, 17, 19).

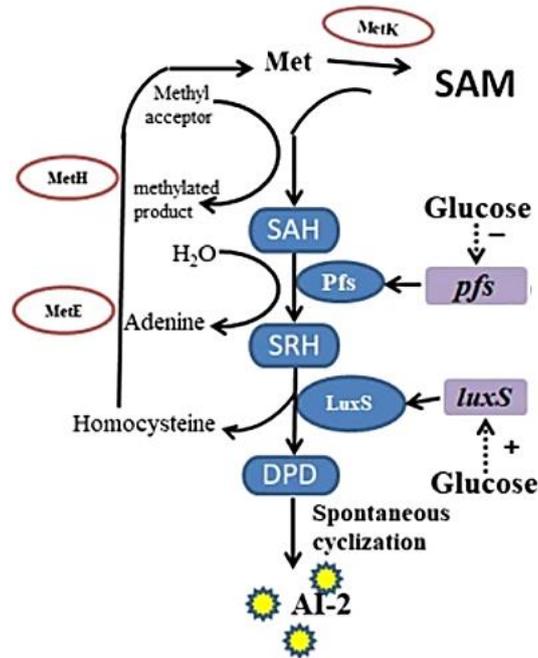


Figura 7. Síntesis del autoinductor 2. La biosíntesis del AI-2 implica una reacción de 3 fases, que forman parte del ciclo de metilo activado (AMC). El primer paso consiste en la eliminación del grupo metilo de la S-adenosil metionina (SAM) catalizada por metiltransferasas. El producto resultante es S-adenosil homocisteína (SAH), que se convierte en S-ribosilcisteína (SRH) por la enzima SAH nucleosidasa, y que a su vez es hidrolizada por la enzima LuxS, produciéndose 5-dihidroxi-2,3-pendandiona (DPD). El DPD sufre una ciclación espontánea, dando lugar al AI-2. Modificado de (18).

4.2.5. Formación de biopelículas

Las biopelículas son matrices poliméricas extracelulares que comprenden diferentes poblaciones bacterianas y que actúan como barreras físicas para proteger a las bacterias de los antimicrobianos y de los mecanismos de defensa del huésped. Permiten a las bacterias su fijación a superficies inertes (catéteres, prótesis ortopédicas, etc.) u orgánicas (válvulas cardíacas, oído medio, pulmones de pacientes con fibrosis quística, etc.). Los principales componentes de la matriz extracelular son un polisacárido extracelular y otras macromoléculas como proteínas y ácidos nucleicos (10, 21).

Una de las características de una biopelícula es la obstinación, es decir, que las concentraciones de antibiótico necesarias para erradicar las bacterias que forman parte de la biopelícula pueden ser hasta 1000 veces mayores que los necesarios para eliminar los microorganismos libres (21). De esta forma, aunque las células replicantes mueran durante

el tratamiento antimicrobiano, las células persistentes van a sobrevivir y a permitir que se produzca la repoblación de la biopelícula (Figura 8) (20, 22).

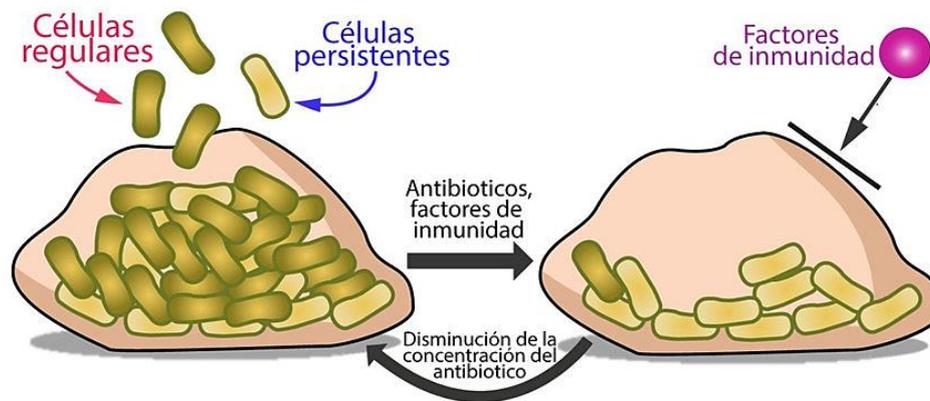


Figura 8. Persistencia y biopelículas. Los antibióticos o los factores de inmunidad destruyen las células regulares que forman la biopelícula, mientras que las células persistentes son capaces de sobrevivir y de repoblar la biopelícula una vez que se produce una disminución de la concentración de los antibióticos (1).

4.3. Relación entre persistencia y resistencia

La persistencia, además de ser un mecanismo de supervivencia al tratamiento con antibióticos por sí misma, también puede contribuir a la evolución de la resistencia mediante diferentes mecanismos (23, 24).

Uno de los mecanismos es a través de la adquisición de mutaciones cromosómicas que conducen a la aparición de resistencia. Debido a que las mutaciones y la persistencia se producen en situaciones de estrés, es lógico pensar que en los mismos entornos puedan coincidir células persistentes y células con altas tasas de mutación. Para comprobar la relación entre ambas, Windels *et al* (2019) escogieron distintos aislados de *E. coli* y monitorizaron la aparición de colonias resistentes en el medio de cultivo *Müller-Hinton* suplementado con ciprofloxacino. Se pudo observar que existe una relación cuantitativa entre generación de persistencia y evolución a resistencia en el 80% de los aislados de *E. coli*. Asimismo, se comprobó que la adquisición de mutaciones se producía con mayor probabilidad en cepas con alta persistencia en contraste con las de baja persistencia, aumentando a su vez la probabilidad de resistencia. Esto se debe a que la alta persistencia aumenta el número de células viables disponibles para la mutación (23).

Por otro lado, las células persistentes también pueden promover la propagación de plásmidos de resistencia. Para probar esta afirmación, en el estudio de Bakkeren *et al* (2019) se escogieron cepas de *Salmonella entérica serovar Typhimurium*, a las cuáles se les aplicó tratamiento antibiótico, siendo estas capaces de sobrevivir, generándose así células persistentes que representaban reservorios de donantes o receptores de plásmidos. La resiembra de estas bacterias en el lumen intestinal después del tratamiento permitió la coexistencia de donantes y receptores, de forma que se observó un 99% de transconjugantes en los 2-3 días posteriores a la resiembra. Por tanto, concluyeron que los persistentes de *S. entérica* pueden servir como reservorios que promueven la propagación de plásmidos conjugativos. Además, se identificaron tres parámetros clave en la transferencia de plásmidos, que pueden limitar la velocidad de la misma: 1) resiembra, es decir, velocidad a la que los donantes pueden volver a entrar en la luz intestinal, 2) tasa de transferencia de plásmidos de transconjugantes a receptores, y 3) tasa de crecimiento relativa de transconjugantes sobre receptores (24).

4.4. Principales estrategias de lucha contra la persistencia

La persistencia produce cada vez más infecciones recurrentes y crónicas que son de difícil tratamiento. Esto ha llevado a que se investiguen estrategias para luchar contra las bacterias persistentes, de modo que en un futuro se puedan aplicar para reducir la implantación de estas infecciones. Algunas de estas estrategias son:

4.4.1. Activación del metabolismo de las células persistentes

Una estrategia prometedora para aumentar la susceptibilidad a los antimicrobianos de las células persistentes consiste en utilizar metabolitos que las sensibilizan transitoriamente al tratamiento, permitiendo la destrucción de las células (25).

Se ha descubierto que la adición de fuentes de carbono como el manitol, glucosa, fructosa o piruvato, podrían restaurar la susceptibilidad de las células persistentes de *E. coli* a los antibióticos, pues estas moléculas consiguen estimular su actividad metabólica. Así, Rishi *et al* (2018) utilizaron glucosa, manitol y glicerol como complemento al tratamiento antibiótico con ampicilina, de forma que observaron una reducción de las células persistentes, sobre todo cuando la ampicilina se combinaba con manitol. Sin embargo, el

tratamiento con ampicilina y manitol no logró destruir completamente las células persistentes, por lo que para potenciar la acción de ambos compuestos se añadió la nisina (antibiótico peptídico policíclico). La nisina fue seleccionada para el estudio porque se ha utilizado durante décadas en la industria alimentaria como conservante, por lo que es seguro *in vivo*. Así, el antibiótico β -lactámico, que produce cambios en la morfología celular, potencia la permeabilización de la nisina a través de la membrana externa bacteriana para que esta pueda formar poros en la membrana interna, lo que permitiría mayor afluencia de antibióticos en el interior de las células (25).

4.4.2. Utilización de potenciadores de los agentes antibacterianos

En ocasiones, el uso de un solo antimicrobiano no es suficiente para erradicar las infecciones bacterianas, por lo que es interesante considerar la combinación con otras moléculas que potencien su acción. Una estrategia que ha demostrado ser útil consiste en combinar tobramicina (TOB) con fumarato como potenciador antibacteriano, la cual ha sido dirigida a reducir las infecciones recurrentes en pacientes con fibrosis quística (FQ) producida por *P. aeruginosa*. La elección de TOB en este estudio se debe a que es un antibiótico de primera línea para tratar las infecciones pulmonares, como es el caso de la FQ (26).

Para simular el tratamiento antimicrobiano con esta combinación en aislados clínicos de pacientes con FQ se realizó un ensayo de tiempo de muerte en fase estacionaria con diferentes cepas de *P. aeruginosa*. Se observó una potenciación de la actividad de TOB gracias al fumarato de 3,5-6 órdenes de magnitud en comparación con la actividad observada con TOB sola (Figura 9) (26).

Aparte de la potenciación descrita anteriormente, el fumarato también tuvo un efecto protector sobre las células epiteliales de las vías respiratorias, ya que redujo la citotoxicidad generada por *P. aeruginosa*. Esto sugiere que la combinación TOB-fumarato puede tener el potencial de disminuir la inflamación de las vías respiratorias (26).

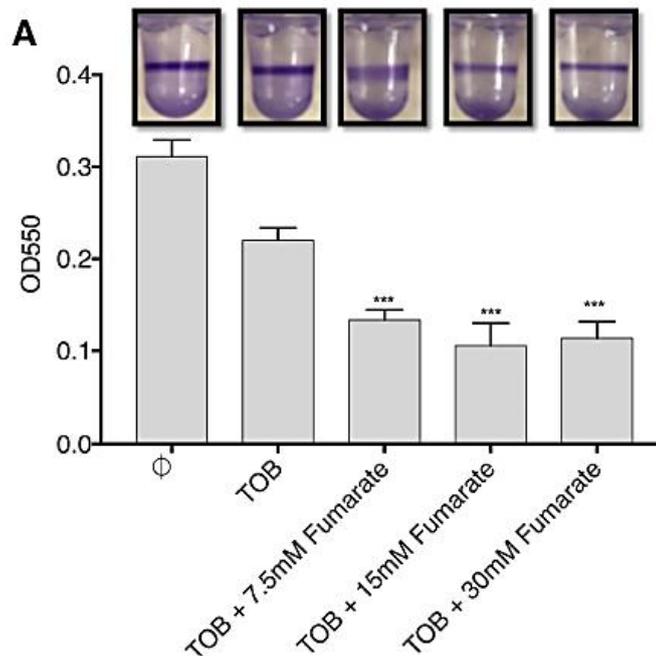


Figura 9. Potenciación de TOB gracias al fumarato en un modelo de biopelícula en placa de 96 pocillos. El efecto de potenciación de TOB por el fumarato se midió con la reducción de la biopelícula usando colorante cristal violeta a una absorbancia de 550 nm. En la imagen se muestra un ejemplo de lo obtenido en algunos de los pocillos de la placa. Se puede observar que, al ir aumentando la concentración de fumarato, disminuye la intensidad del color violeta, lo que indica a su vez la reducción de la biopelícula. Esto se traduce en una mayor eficacia del tratamiento antimicrobiano (26).

4.4.3. Incrementar la entrada del antibiótico en la bacteria

Algunas bacterias persistentes, como *S. aureus*, son capaces de sobrevivir en el interior de las células epiteliales y estas actúan como un compartimento protector que disminuye la penetración del antibiótico, dificultándose el tratamiento de las infecciones (27).

Con el fin de evitar este problema, se han desarrollado nanopartículas lipídicas derivadas de antibióticos para aumentar la entrada de los mismos a través de la membrana celular de la bacteria. Para sintetizarlas, se conjugó un antibiótico, la penicilina G (PenG), con dos tipos de lípidos (una cadena de lípidos (L) y una cadena de fosfolípidos (PL)). El lípido PenG-L se preparó instalando dos cadenas de estearoilo en los grupos hidroxilo extendidos de la PenG, mientras que el fosfolípido PenG-PL se formó añadiendo fosfato de dicetilo modificado a la PenG (Figura 10) (27).

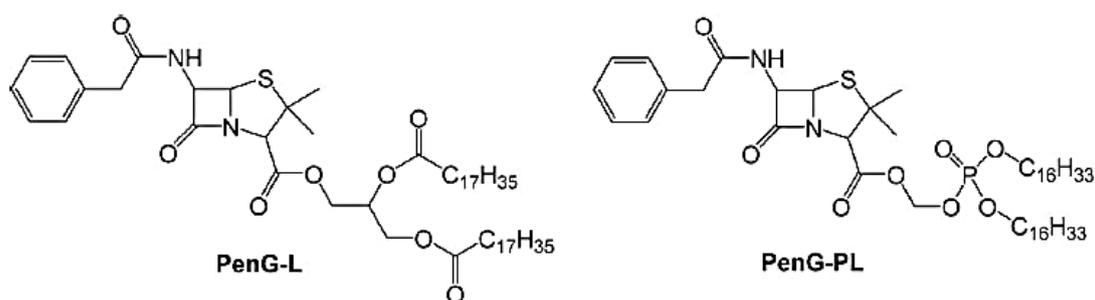


Figura 10. Estructuras químicas de los conjugados de lípidos y antibióticos. Se puede observar que el lípido PenG-L contiene dos cadenas de estearoilo asociados al grupo hidroxilo de la penicilina G, mientras que el lípido PenG-PL contiene un grupo fosfato diacetilo modificado (27).

Utilizando células epiteliales pulmonares infectadas con la bacteria *S. aureus* como modelo de infección se cuantificó la tasa de liberación del fármaco de las nanopartículas, obteniéndose que PenG-PL liberaba el antibiótico mucho más rápido que PenG-L. Además, mediante un ensayo de inhibición se demostró que los conjugados PL tenían actividad antibacteriana, mientras que los L no la poseían. Esto podría deberse a que los fosfolípidos ayudaron a anclar el antibiótico a la membrana de la bacteria mediante su parte lipídica. De esta forma, se observó que las nanopartículas de fosfolípidos derivadas de PenG pudieron eliminar hasta el 99,9% de las bacterias de *S. aureus* intracelulares, siendo más eficaces que el tratamiento con PenG libre con la misma concentración de fármaco (27).

5. Conclusiones

1. El estado de latencia no es suficiente para que las células adquieran persistencia. Están implicados otros mecanismos, siendo los módulos toxina-antitoxina, la señalización a través de ppGpp, la señal de *quorum*, la respuesta SOS y la formación de biopelículas, los más estudiados.
2. Cada vez son más las investigaciones que relacionan el fenómeno de la persistencia con la aparición de resistencia bacteriana, estando involucrados mecanismos como la HGT y las mutaciones. Debido a esta relación, las terapias anti-persistencia podrían ser una táctica importante para reducir la resistencia de forma indirecta.
3. Las principales estrategias anti-persistencia que se encuentran en estudio son la potenciación de la acción de los antibióticos, la activación del metabolismo de las células persistentes y el incremento de la entrada de antibiótico en las mismas, entre otras.
4. Es fundamental continuar la investigación del fenómeno de la persistencia, ya que conocer en profundidad los diferentes mecanismos implicados permitirá avanzar en el desarrollo de terapias anti-persistencia que contribuirán al tratamiento más adecuado de las infecciones bacterianas.

6. Bibliografía

1. Suclupe-Campos, D.-O., & Aguilar-Gamboa, F.-R. (2020). Persistencia bacteriana: un fenotipo celular de importancia clínica en infecciones crónicas y recurrentes. *Horizonte Médico (Lima)*, 20(1), 77–87.
2. Bakkeren, E., Diard, M., & Hardt, W. D. (2020, September 1). Evolutionary causes and consequences of bacterial antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*. Nature Research.
3. Balaban, N. Q., Helaine, S., Lewis, K., Ackermann, M., Aldridge, B., Andersson, D. I., Zinkernagel, A. (2019). Definitions and guidelines for research on antibiotic persistence. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7), 441–448.
4. Dewachter, L., Fauvart, M., & Michiels, J. (2019, October 17). Bacterial Heterogeneity and Antibiotic Survival: Understanding and Combatting Persistence and Heteroresistance. *Molecular Cell*. Cell Press.
5. Orman, M. A., & Brynildsen, M. P. (2013). Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(7), 3230–3239.
6. Pu, Y., Zhao, Z., Li, Y., Zou, J., Ma, Q., Zhao, Y., Bai, F. (2016). Enhanced Efflux Activity Facilitates Drug Tolerance in Dormant Bacterial Cells. *Molecular Cell*, 62(2), 284–294.
7. Habib, G., Zhu, J., & Sun, B. (2020). A novel type I toxin-antitoxin system modulates persister cell formation in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Medical Microbiology*, 310(2).
8. Walling LR, Butler JS. (2016, Nov 18). Structural Determinants for Antitoxin Identity and Insulation of Cross Talk between Homologous Toxin-Antitoxin Systems. *J Bacteriol*, 198(24):3287-3295.
9. Deter, H. S., Jensen, R. V., Mather, W. H., & Butzin, N. C. (2017). Mechanisms for Differential Protein Production in Toxin-Antitoxin Systems. *Toxins*, 9(7), 211.
10. Pacios, O., Blasco, L., Bleriot, I., Fernandez-Garcia, L., Ambroa, A., López, M., Bou, G., Cantón, R., Garcia-Contreras, R., Wood, T. K., & Tomás, M. (2020). (p)ppGpp and Its Role in Bacterial Persistence: New Challenges. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 64(10), e01283-20.
11. Svenningsen, M. S., Veress, A., Harms, A., Mitarai, N., & Semsey, S. (2019). Birth and Resuscitation of (p)ppGpp Induced Antibiotic Tolerant Persister Cells. *Scientific Reports*, 9(1).
12. Bhaskar, A., De Piano, C., Gelman, E., McKinney, J. D., & Dhar, N. (2018, September 1). Elucidating the role of (p)ppGpp in mycobacterial persistence against antibiotics. *IUBMB Life*. Blackwell Publishing Ltd.

13. Theodore, A., Lewis, K., & Vulić, M. (2013). Tolerance of *Escherichia coli* to fluoroquinolone antibiotics depends on specific components of the SOS response pathway. *Genetics*, 195(4), 1265–1276.
14. Qin, T. T., Kang, H. Q., Ma, P., Li, P. P., Huang, L. Y., & Gu, B. (2015). SOS response and its regulation on the fluoroquinolone resistance. *Annals of translational medicine*, 3(22), 358.
15. Chen, L., Wilksch, J. J., Liu, H., Zhang, X., Torres, V. V. L., Bi, W. Zhou, T. (2020). Investigation of Lux S-mediated quorum sensing in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 69(3), 402–413.
16. Yadav, M. K., Vidal, J. E., Go, Y. Y., Kim, S. H., Chae, S. W., & Song, J. J. (2018). The LuxS/AI-2 Quorum-Sensing System of *Streptococcus pneumoniae* Is Required to Cause Disease, and to Regulate Virulence- and Metabolism-Related Genes in a Rat Model of Middle Ear Infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 138.
17. Rao, R. M., Pasha, S. N., & Sowdhamini, R. (2016). Genome-wide survey and phylogeny of S-Ribosylhomocysteinase (LuxS) enzyme in bacterial genomes. *BMC genomics*, 17(1), 742.
18. Wang, Y., Wang, Y., Sun, L., Grenier, D., & Yi, L. (2018). The LuxS/AI-2 system of *Streptococcus suis*. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(17), 7231–7238.
19. Perez, A. C., Pang, B., King, L. B., Tan, L., Murrah, K. A., Reimche, J. L., Wren, J. T., Richardson, S. H., Ghandi, U., & Swords, W. E. (2014). Residence of *Streptococcus pneumoniae* and *Moraxella catarrhalis* within polymicrobial biofilm promotes antibiotic resistance and bacterial persistence in vivo. *Pathogens and disease*, 70(3), 280–288.
20. Kwan, B. W., Valenta, J. A., Benedik, M. J., & Wood, T. K. (2013). Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(3), 1468–1473.
21. Domenech, M., & García, E. (2017). N-Acetyl-l-Cysteine and Cysteamine as New Strategies against Mixed Biofilms of Nonencapsulated *Streptococcus pneumoniae* and Nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 61(2), e01992-16.
22. Lewis K. (2012). Persister cells: molecular mechanisms related to antibiotic tolerance. *Handbook of experimental pharmacology*, (211), 121–133.
23. Windels, E. M., Michiels, J. E., Fauvart, M., Wenseleers, T., Van den Bergh, B., & Michiels, J. (2019). Bacterial persistence promotes the evolution of antibiotic resistance by increasing survival and mutation rates. *ISME Journal*, 13(5), 1239–1251.
24. Bakkeren, E., Huisman, J. S., Fattinger, S. A., Hausmann, A., Furter, M., Egli, A., Slack, E., Sellin, M. E., Bonhoeffer, S., Regoes, R. R., Diard, M., & Hardt, W. D. (2019). *Salmonella* persisters promote the spread of antibiotic resistance plasmids in the gut. *Nature*, 573(7773), 276–280.

25. Rishi, P., Bhagat, N. R., Thakur, R., & Pathania, P. (2018). Tackling *Salmonella* Persister Cells by Antibiotic–Nisin Combination via Mannitol. *Indian Journal of Microbiology*, 58(2), 239–243.
26. Koeva, M., Gutu, A. D., Hebert, W., Wager, J. D., Yonker, L. M., O’Toole, G. A. Joseph-McCarthy, D. (2017). An antipersister strategy for treatment of chronic *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(12).
27. Zhang, C., Zhao, W., Bian, C., Hou, X., Deng, B., McComb, D. W., Chen, X., & Dong, Y. (2019). Antibiotic-Derived Lipid Nanoparticles to Treat Intracellular *Staphylococcus aureus*. *ACS applied bio materials*, 2(3), 1270–1277.