Persistencia bacteriana: un fenotipo celular de importancia clínica en infecciones crónicas y recurrentes

Danny-Omar Suclupe-Campos [1,a]; Franklin-Rómulo Aguilar-Gamboa* [2,a]

RESUMEN

Los persistentes bacterianos son variantes transitorias de una población genéticamente homogénea, generada por exposición al estrés, como el que ocurre durante el tratamiento antibiótico. Es un fenómeno epigenético o un fenotipo no heredado, que puede ser llamado primera línea de defensa antes de que se adquiera la resistencia antimicrobiana. A pesar de su descubrimiento hace más de 70 años, su definición, mecanismos de formación, clasificación y morfologías adoptadas de implicancia clínica son temas de investigación actual. En el presente estudio se describe la relación de persistentes con infecciones crónicas y formación de biopelículas como factores importantes en la recaída, recidivas y mayor virulencia en las infecciones. Así mismo, se hace una revisión breve de los diversos mecanismos implicados en la persistencia bacteriana y su eliminación ineficaz por tolerancia antibiótica para terminar con la presentación de posibles estrategias de tratamiento. En conjunto, se cree que la persistencia impone una carga significativa de atención en salud pública, que se estima, provocará hasta 10 millones de víctimas al año para el 2050. Una mejor comprensión de este fenotipo es fundamental en la lucha contra las bacterias patógenas con la finalidad de obtener una mejor perspectiva en las terapias futuras.

Palabras clave: Sistemas toxina-antitoxina; Biopelículas; Farmacorresistencia bacteriana (Fuente: DeCS BIREME).

Bacterial persistence: a cellular phenotype of clinical significance in chronic and recurrent infections

ABSTRACT

Persistent bacteria are the transient variants of a genetically homogeneous population generated by exposure to stress as in antibiotic treatment. They are an epigenetic phenomenon or a non-inherited phenotype, which may be considered as the first line of defense before developing antimicrobial resistance. Despite their discovery more than 70 years ago, their definition, mechanisms of formation, classification and morphologies of clinical implication are still current research topics. In the present research, we describe the relationship between chronic persistent infections and the formation of biofilms as important factors in recurrences, relapses and greater virulence in infections. Likewise, a brief review of the various mechanisms involved in bacterial persistence, their ineffective elimination due to antibiotic tolerance and possible treatment strategies is provided. Overall, it is believed that persistence poses a significant burden of public health care. It is estimated that up to 10 million people will be yearly affected by 2050. Thus, a better comprehension of this bacterial phenotype is essential to fight against pathogenic bacteria and improve therapeutic results in the future.

Keywords: Toxin-antitoxin systems; Biofilms; Drug resistance, bacterial (Source: MeSH NLM).

1 Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Laboratorio de Microbiología. Lambayeque, Perú.
2 Hospital Regional Lambayeque, Dirección de Investigación, Laboratorio de Inmunología y virología. Chiclayo, Perú.
a Microbiólogo.
* Autor corresponsal

INTRODUCCIÓN

Los persistentes o células persistentes bacterianas son variantes transitorias de una población genéticamente homogénea, que pueden sobrevivir a la exposición de estrés, como el tratamiento antibiótico, y generan latencia celular [1]. En contraste con la resistencia causada por mutaciones genéticas, la tolerancia a los antibióticos por los persistentes se produce por la varianza fenotípica del tipo salvaje.

La reinoculación (crecimiento) de células persistentes regenera la población sensible original [2,3], por lo que los persistentes son considerados variantes fenotípicas pero no mutantes [4] o productos de un fenómeno epigenético no heredado [5-8] (Figura 1). Este fenotipo fue descrito por primera vez en 1942 por Hobby et al. cuando encontraron que el 1 % de *Staphylococcus aureus* sobrevivió al tratamiento con penicilina [9]. En 1944, Joseph Bigger observó los mismos resultados en infecciones estafilocócicas tratadas con penicilina y acuñó el término "persistentes" para denominar a estas células tolerantes [10-12]. Chain y Duthie, en 1945, aseguraron que la penicilina no mataba por completo a *Staphylococcus spp*. hasta que se usaron tratamientos más largos, y que las células de fase estacionaria (es decir, células que no proliferaban) eran casi completamente insensibles a la penicilina[13]. En los años siguientes, el tema de persistencia fue rápidamente olvidado y se tomó mayor interés a la relación entre resistencia bacteriana y el descubrimiento de nuevos antibióticos (era dorada, desde 1940 a 1960). Las observaciones de persistentes fueron ignoradas debido a la dificultad de aislarlos, su naturaleza transitoria, su baja cuantía y similitud con el tipo de célula viable pero no cultivable [14]. Sin embargo, con el descubrimiento y selección de mutantes de alta persistencia a la ampicilina en *Escherichia coli* realizado por Harris Moyed en 1980, y con ayuda de estudios moleculares, se llegó a comprender mejor este fenómeno que, desde entonces, se ha observado en muchas especies bacterianas [1,15,16].

Una población bacteriana inicialmente está formada por células sensibles a los antibióticos (color rojo) las cuales pueden ser erradicadas después de la terapia antibiótica y solo las que adquirieron resistencia volverían a crecer, de modo que la nueva población estaría formada únicamente por células resistentes (color negro) como resultado de la selección de subpoblaciones que han adquirido genes de resistencia o que ya los poseían. La misma población bacteriana puede contener también células persistentes (color azul) originadas después del tratamiento antibiótico por un cambio de fenotipo sensible a fenotipo tolerante y que, al volver a crecer sin ninguna exposición al estrés, exhibirían el mismo patrón de sensibilidad que la población original (Figura 1).

Figura 1. Comparación entre resistencia y persistencia. Modificado a partir del artículo Role of persister cells in chronic infections: Clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. (M. Fauvart, V. N. De Groote, J. Michiels, Journal of Medical Microbiology. 2011; 60:699–709)

La presencia de persistentes puede ser causa importante de infecciones bacterianas crónicas [17], lo que da lugar a la recalcitrancia, que se ha relacionado con un aumento en el riesgo de aparición de resistencia a los antibióticos durante el tratamiento [3]. Claramente, la persistencia debe ser una causa de preocupación global, ya que agrava la perspectiva de la actual crisis antibiótica, que se estima provocará hasta 10 millones de víctimas al año para el 2050 [18,19]. Los estudios de persistencia bacteriana tienen similitudes en términos de mecanismos, tratamiento, tanto en animales, parásitos, hongos, virus, células tumorales, por lo que los nuevos fármacos y vacunas son críticos para mejorar el

tratamiento [20]. A pesar de su descubrimiento hace más de 70 años, los mecanismos de persistencia bacteriana son complejos y poco conocidos. Estudios recientes han identificado una serie de genes y vías que intervienen en la formación de persistentes (Figura 2). Estas incluyen módulos toxina-antitoxina (TA), respuesta estricta por (p) ppGpp, reparación o protección del ADN (respuesta SOS), metabolismo reducido del fosfato, estrés celular, limitación de nutrientes, producción de energía alternativa, inhibición en la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, degradación de proteínas, transportadores/sistemas de eflujo, reguladores transcripcionales. Tensiones más generales, como pH extremo, choque térmico, radiación, defensa antioxidante, fagos, las biopelículas y macrófagos, también se han asociado a la formación de persistentes [3,4,11,20-26].

La resistencia bacteriana implica una serie de cambios genéticos heredados (genes de resistencia, plásmidos) mecanismos enzimáticos (enzima alteradoras, degradadoras), cambios estructurales y funcionales (impermeabilidad, bombas de eflujo), alteraciones de sitio diana, que hacen ineficiente la terapia antibiótica. En contraste, la persistencia bacteriana implica una variación fenotípica no heredada, que se presenta en genes y mecanismos (respuesta SOS, sistemas TA, detección de *quorum*, respuesta estricta (p)ppGpp, metabolismo reducido del ATP, bombas de eflujo, formación de *biofilms*) que se activan en respuesta a una gran variedad de tensiones ambientales de estrés y permiten su adaptación y supervivencia (Figura 2).

Figura 2. Diferencias entre resistencia y persistencia bacteriana, modificado a partir de los artículos Metabolic aspects of bacterial persisters. (Prax M, Bertram R, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2014; 4(10):1–6), Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. (Kim J-S, Wood TK, MBio. 2017; 8(2)), Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. (Maisonneuve E, Gerdes K, Cell. 2014; 157(3):539–48)

1.¿Qué es persistencia bacteriana?

La persistencia bacteriana es un conjunto grande y heterogéneo de fenómenos fisiológicos que ocurre en una subpoblación pequeña de células bacterianas salvajes llamadas células persistentes o persistentes bacterianos [27-30]. Estas células se forman en respuesta a una gran variedad de tensiones ambientales de estrés (como la limitación de nutrientes o exposición al daño por antibióticos), se adaptan con éxito al cambio ambiental [3], se vuelven tolerantes y expresan un rango epigenético no heredado (inmutable) a su progenie [6], rasgo que las diferencia de la resistencia antimicrobiana, en la que sí existe una verdadera mutación (Figura 2). La aparición de estas células es espontánea y ocurre en alguna parte del ciclo celular como variantes fenotípicas raras de tipo salvaje [31], fenotipo de resistencia, subpoblación tolerante [2,7,29,32] o denominadas por algunos autores como células multirresistentes a los medicamentos [33-34], que pueden tener una morfología indistinguible a las células susceptibles a los antibióticos (fenotipo salvaje) [27]. Estas células se caracterizan por tener un estado metabólico latente o quiescente (metabolismo reducido), con funciones deprimidas o carecer de ellas (transcripción, traducción, bajo niveles de producción de energía ATP y fuerza motriz protónica (Figura 2) [28,33,35-37].

La latencia es una característica primordial en los persistentes, y se define como el estado que implica el cierre metabólico reversible (metabolismo inactivo) que permite a las células escapar de la acción letal de los antibióticos [37], donde muchos sitios diana están inactivos, lo que explica la ineficacia de estos últimos. Sin embargo, el concepto de que los persistentes son bacterias latentes no replicantes suele generar conflictos y es tema aún de debate, y ha sido cuestionado

en los últimos años por varios estudios [23] que definen persistencia como un fenómeno mucho más complejo en términos de latencia [31], donde en lugar de una aparente falta de crecimiento (metabolismo inactivo) en persistentes, estos sí presentarían actividad metabólica activa, que se manifiesta en la sobreexpresión y aumento en la actividad de las bombas de eflujo para las drogas (Figura 2) [20,38,39], capacidad de replicación y una aparente estabilidad de su población como resultado de un equilibrio dinámico entre muerte y replicación bacteriana, lo que hace mucho más compleja la definición de persistencia que se asocia a múltiples fenómenos metabólicos adicionales, lo que la aleja de ser un simple sinónimo de latencia [23,25].

1.1 Modelos de clasificación

Los persistentes bacterianos pueden clasificarse en dos grupos, tipo I y tipo II. Los persistentes de tipo I se forman después de la fase estacionaria, en respuesta a desencadenantes externos como la falta de nutrientes, y no pueden volver al fenotipo normal sensible; tienen una frecuencia de 1 % en biopelículas bacterianas y cultivos de fase estacionaria [28]. Los persistentes de tipo II son de crecimiento lento, se forman durante la fase exponencial (con una frecuencia de 0,0001 a 0,001 %) [28] y se cree que derivan de fluctuaciones aleatorias en el ruido transcripcional y traslacional por un cambio de fenotipo sin intervención de desencadenantes externos y pueden retomar el fenotipo normal [11,21]. Aunque los tipos I y II resultan útiles para la clasificación, vale la pena señalar que este fenotipo es mucho más heterogéneo. Los persistentes pueden adoptar diferentes tamaños y formas, desde una morfología regular o alterada (cocoide, granular, filamentosa) hasta morfologías atípicas, pleomórficas o deficientes de pared celular como las formas L [40,41] generadas como parte del ciclo de vida de las bacterias estresadas y que han sido implicadas en infecciones persistentes por *biofilms* [20].

1.2 Mecanismos implicados en la formación de persistentes

Persistencia bacteriana mediante módulos toxina-antitoxina (TA)

Los módulos toxina-antitoxina (TA) son los principales modelos de persistencia bacteriana estudiados, sobre todo en bacterias gramnegativas [17], se conoce muy poco sobre la formación de persistentes mediante este modelo en grampositivos. Su función en las bacterias no se conoce con precisión, se ha sugerido que el sistema activa la muerte celular programada en respuesta al estrés, inanición, daño al ADN y exposición a los antibióticos. Por otro lado, se plantea que actúa como inhibidor de la síntesis de macromoléculas esenciales lo que genera latencia celular reversible al crecimiento [9,30]. Los módulos TA están muy sobreexpresados en las células persistentes en comparación con el resto de la población [8]. Por ejemplo, *Escherichia coli* K-12 contiene al menos 36 módulos TA [42] y el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* contiene 88 módulos [43], más que cualquier otro patógeno humano [44].

Típicamente, están constituidos por dos genes expresados como un operón, codificados por genomas y plásmidos bacterianos [7,16]; uno de los genes codifica una toxina estable (siempre una proteína) que interrumpe un proceso celular esencial, como la replicación, transcripción, traducción; y el otro gen codifica una antitoxina lábil (ya sea ARN o una proteína inestable), que neutraliza la toxina y también actúa como un autorregulador de su expresión (Figura 2) [12].

Estos sistemas se han encontrado en bacterias como *E. coli* que posee el gen HipA (un factor de persistencia crítico) que detiene la síntesis de ADN, ARN y proteínas, lo que inhibe el crecimiento en un 90 % de las células [28] y que es normalmente neutralizado por el gen HipB, un represor

Figura 3. Modelo de formación de persistentes por daño en el ADN. Modificado a partir del artículo Persister Cells and the Paradox of Chronic Infections. (Lewis K, Microbe. 2010; 5(10):429–37)

de la transcripción del gen HipA [15,45,46]. Recientemente, se descubrió que bacterias como *Bartonella schoenbuchensis*, Y*ersinia enterocolitica* y *Pseudomonas aeruginosa* producen toxinas cíclicas de AMP(Fic) que bloquean la actividad de la topoisomerasa IV y la ADN-girasa (que regulan el anudamiento, filamentación y concatenación del cromosoma bacteriano), y logran detener el crecimiento [47]. También se encontró que los módulos toxina-antitoxina tipo II estaban regulados positivamente durante la infección de macrófagos por *Salmonella typhimurium*, y que la eliminación de estos conducía a una disminución significativa en los niveles de formación de persistencia inducida por el estrés oxidativo dentro de los macrófagos [48].

Respuesta SOS y formación de persistentes

La respuesta SOS se desencadena por daño en el ADN y permite su reparación. Esta respuesta se puede considerar como un mecanismo importante de supervivencia bacteriana bajo condiciones de estrés. La respuesta SOS involucra genes que afectan los procesos celulares, como la recombinación y reparación del ADN, y también la patogénesis, la resistencia a los antimicrobianos y la producción de biopelículas [32]. Las proteínas que componen el sistema SOS incluyen un represor transcripcional llamado LexA y una proteína activadora de unión al ADN, RecA (Figura 3). Sin embargo, otras proteínas pueden estar involucradas. El sistema SOS contribuye a la reparación del ADN pero también induce el desarrollo de módulos TA [49]. Una de las principales toxinas responsable de la formación de persistentes en respuesta SOS, es la toxina TisB, un péptido hidrofóbico de 29 aminoácidos que se une a la membrana celular, interrumpe la fuerza motriz protónica, conduce a la disminución de los niveles de ATP y, como consecuencia, la inactivación celular (Figuras 2 y 3). Esta toxina está presente en el módulo TA de tipo I en *E. coli*, y se expresa en respuesta al daño causado en el ADN por antibióticos como el ciprofloxacino, que bloquea la actividad ligasa de la ADN girasa y topoisomerasa, para convertirlas en endonucleasas [12,34] que dañan al ADN, lo que induce la respuesta SOS que regula su reparación, y también causa la expresión de la toxina TisB a un nivel alto, lo que provoca una disminución en la fuerza motriz protónica y los niveles de ATP, y lleva a la célula a un estado persistente y tolerante a los antibióticos (Figura 3). Diversos estudios muestran que la administración por etapas de ciprofloxacino induce la formación de persistentes en una forma dependiente de TisAB, y que las células que producían la toxina son tolerantes a múltiples antibióticos. El descubrimiento de TisB, y su papel en la tolerancia antibiótica, abre una posibilidad intrigante de un vínculo más amplio entre otras respuestas de estrés y la formación de persistentes.

Detección de *quorum* y formación de persistentes

La detección de *quorum*, *quorum sensing* (QS) o red de comunicación bacteriana permite a las células modificar su comportamiento colectivo a través de pequeñas moléculas de señalización llamadas autoinductores (similares a las hormonas de los mamíferos) que favorecen la formación de células persistentes de acuerdo con los cambios en el entorno. Estas moléculas controlan procesos específicos como la formación de biopelículas (Figura 2), la expresión de genes que regulan virulencia, la producción de toxinas, la motilidad, la quimiotaxis, la competencia bacteriana (sistemas de secreción T3SS y T6SS), la bioluminiscencia, la producción de metabolitos secundarios, la transferencia de plásmidos y la esporulación, entre otros [32,50,51]. La detección de *quorum* es importante debido al aumento de persistentes al entrar a la fase estacionaria, y porque permite controlar la densidad celular [52,53]. El primer proceso fisiológico regulado por *quorum sensing* que se estudió fue la bioluminiscencia producida por dos bacterias marinas *Vibrio fischeri* y *Vibrio harveyi* , relacionada con el control de su densidad celular, que demuestra que la bioluminiscencia no es proporcional al aumento poblacional y que aumenta a medida que las bacterias entran a fase estacionaria [54]. La relación de *quorum sensing* como inductor de persistencia en grupos bacterianos en un principio era rechazada; sin embargo, estudios posteriores encontraron que las moléculas con capacidad de detectar el *quorum* (como la piocianina y la N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona (3-OC12-HSL) en *P. aeruginosa*), aumentan el número de persistentes en una población polimicrobiana sin afectar persistencia en otras especies como *E. coli* o *S. aureus* [5].

En *S. aureus*, el sistema Agr, un conjunto de cuatro genes (Agr A, B, C, D), produce oligopéptidos modificados que funcionan como autoinductores de detección de *quorum* con funciones muy específicas. Estas moléculas permiten que *S. aureus* exprese factores proteicos de adherencia y colonización de superficies cuando la densidad celular baja, asociado con la formación del fenotipo de persistencia mediante este sistema. Sin embargo, a elevadas concentraciones celulares (metabolismo activo) la síntesis de estos factores se reprime y la bacteria comienza a secretar sus factores de virulencia [24,32,50,55].

Otra molécula que detecta *quorum* en *P. aeruginosa* es la 2-amino acetofenona que también induce la formación de persistencia, muy probablemente, al cerrar la actividad de traducción [56]. La piocianina producida por *P. aeruginosa* muestra inducción de persistencia en otras especies, como *Acinetobacter baumannnii*, en entornos polimicrobianos naturales. El efecto del indol apoya esta hipótesis. El indol es un metabolito producido en fase estacionaria e interviene en diferentes procesos como estabilización de plásmidos, síntesis de biopelículas y formación de esporas, actúa como una molécula que detecta e induce persistencia en especies

como *E. coli* [57]. Dado que muchas bacterias producen indol, este mecanismo podría estar muy extendido. Esto se corrobora por el hecho de que *Salmonella typhimurium*, incapaz de producir indol por sí misma, puede interceptar la señal de *E. coli* y, posteriormente, utilizarla para aumentar los niveles de persistencia *in vivo*. Aunque hay diversos estudios que muestran que la persistencia inducida por la percepción del *quorum* es posible, todavía falta mucho por investigar en este contexto debido a la amplia complejidad del metabolismo bacteriano para apoyar esta hipótesis [11].

Papel de (p)ppGpp como regulador global y formador de persistentes

Las bacterias sintetizan (p)ppGpp (guanosina tetrafosfato y pentafosfato), llamadas moléculas reguladoras globales de alarma bacteriana "alarmone" [26], en respuesta estricta a una variedad de tensiones ambientales de estrés, como la limitación de nutrientes o el ataque antibiótico. Esto facilita la supervivencia, adaptación y formación de subpoblaciones bacterianas persistentes. Los (p)ppGpp son nucleótidos con gran influencia en la fisiología y metabolismo bacteriano, al regular directa o indirectamente muchos procesos celulares críticos, como la replicación, transcripción, traducción, división celular, formación de *biofilms*, motilidad, competencia, virulencia [58-61]. Su función de alarma frente a tensiones ambientales, como la limitación de nutrientes, hace que aumente sus niveles intracelulares y se encuentre muy relacionado con módulos TA en especies bacterianas patógenas como *E. coli*. Los (p)ppGpp activan la proteasa Lon en respuesta a la inanición, la que degrada a las proteínas antitoxinas, y las toxinas liberadas pueden escindir ARNm, lo que frena la transcripción y traducción e induce la detención del crecimiento (Figura 2) [23,39,62-64].

Pero también tiene función de regulador en la estructura y formación de biopelículas en *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* cuando estas bacterias se encuentran frente a estrés antibiótico e inanición de nutrientes [26,65,66]. Los (p)ppGpp actúan, además, como reguladores estrictos en la detección de *quorum* (QS). Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa*, activan la transcripción del autoinductor detector de *quorum* N-(3-oxododecanoil)-homoserina lactona (3-OC12-HSL), y mejoran la adaptabilidad de las bacterias con la formación de biopelículas [67,68]. En *E. coli*, los (p) ppGpp aumentan la producción de indol en respuesta al estrés oxidativo y la exposición antibióticos, pero también actúan como inhibidores de la síntesis de peptidoglucano y fosfolípidos [30], que son algunas de las funciones principales que contribuyen en la persistencia bacteriana. No obstante, su acción como reguladores globales de diversos procesos en el metabolismo bacteriano, sigue siendo tema de investigaciones actuales.

2. Persistencia bacteriana e infecciones persistentes

Las formas persistentes dificultan el tratamiento de muchas enfermedades. Varios factores, del agente patógeno y del huésped, contribuyen al establecimiento y mantenimiento de estas infecciones, incluida la resistencia a los antibióticos e inmunosupresión [3]. Estas formas de persistencia también se pueden manifestar en pacientes inmunocompetentes, donde el patógeno se encuentra en sitios poco accesibles para los componentes del sistema inmune [69].

Una gran variedad de bacterias origina infecciones persistentes, como *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella*, *Chlamydia*, *Brucella*, *Borrelia*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* solo por indicar algunos grupos [23]. Las infecciones bacterianas asintomáticas persistentes (subclínicas) o sintomáticas, pueden tener lugar en diversos tejidos dentro del huésped, como el sistema inmunitario, el sistema nervioso central *(Treponema pallidum)*, donde causan meningitis *(Neisseria meningitidis)*, en macrófagos o granulomas *(Mycobacterium tuberculosis)*, en el estómago *(Helicobacter pylori)*, la vesícula biliar (*S. enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi) [70,71]. Las infecciones asintomáticas persistentes también pueden ser causadas por bacterias latentes de crecimiento detenido y se asocian con recaídas de infecciones sintomáticas agudas. Por ejemplo, el 10 % de las personas que están infectadas con *M. tuberculosis* latente luego de una infección aguda inicial, recaerán durante su vida. La fiebre tifoidea se repite en el 15 % de los pacientes después del tratamiento con antibióticos, y luego de una infección del tracto urinario (ITU) causada por *E. coli* uropatógena (UPEC), el 27 % de las mujeres sufrirá una recaída. Otras infecciones bacterianas, incluida la amigdalitis estreptocócica, tienden a reaparecer después del tratamiento con antibióticos y es probable que tengan un período de latencia en el huésped [3].

3. Biopelícula y estado persistente

Una biopelícula es una población de células que crece en una superficie encerrada por una matriz extracelular de sustancias mucoides (exopolisacáridos, mucoproteínas, lípidos e, incluso, ADN extracelular, etc.) difíciles de erradicar y fuente de infecciones recalcitrantes [1,3,72-74] que causan una mortalidad aproximada de 100 mil personas al año con un costo de 28 a 54 mil millones de dólares en los Estados Unidos [75]. Las biopelículas se forman en dispositivos médicos permanentes o dentro de los tejidos y son responsables de infecciones en catéteres, prótesis ortopédicas, válvulas cardíacas, oído medio (otitis), heridas que no cicatrizan y en pulmones de pacientes con fibrosis quística [69]. Las células persistentes crecen exponencialmente en la biopelícula y se convierten en una fracción significativa de la población en la fase estacionaria (hasta 1 %) [17]. Un *biofilm* está formado por células regulares y células persistentes que se liberan en los tejidos y entran en la circulación. Aunque los antimicrobianos matarían las células normales que crecen en la superficie de la biopelícula, los persistentes sobrevivirían (protegidas por la matriz del *biofilm*), reanudarían el crecimiento y repoblarían la biopelícula después de retirar el antimicrobiano (con una concentración antibiótica baja y

sin señal de estrés) para mantener la infección a pesar de la terapia prolongada [12,13] (Figura 4). Se cree que varios factores contribuyen a la tolerancia antibiótica en las biopelículas, incluida la penetración limitada de los antibióticos a través de la matriz extracelular, el crecimiento lento de bacterias debido a la restricción de nutrientes y oxígeno, desechos metabólicos acumulados y cambios fisiológicos desencadenados por señalización de *quorum* entre células [7]. Las biopelículas pueden bloquear la muerte mediada por el complemento y células del sistema inmune en muchas infecciones persistentes, como las asociadas a dispositivos permanentes [3].

Figura 4. Modelo de persistencia bacteriana en *biofilm* causante de infecciones recurrentes. Modificado a partir del artículo Persister Cells. (Lewis K, Annual Review of Microbiology. 2010; 64(1):357–72)

Varios microorganismos relevantes para la salud pública forman biopelículas. Entre ellos destacan *S. aureus* (también las cepas resistentes a la meticilina), *S. epidermidis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Salmonella spp*. *Vibrio cholera*, *Candida parapsilosis* y *C. albicans*. Estos han sido descritos en vejiga, pulmón de pacientes con neumonía por fibrosis quística, y en vesícula biliar. En este sentido, la formación de persistentes es, probablemente, un factor importante en la recaída y recalcitrancia de los procesos infecciosos [3,76].

4.Eliminación ineficaz y tolerancia antibiótica en persistentes bacterianos

El fracaso en el tratamiento puede deberse a la falta de cumplimiento en la terapia por parte del paciente, la llegada deficiente del fármaco hacia el sitio diana, el estado de latencia celular, entre otros. Aunque se postula que la tolerancia a múltiples fármacos en persistentes es un fenómeno fenotípico, es posible que bajo ciertas condiciones los persistentes adquieran mutaciones y desarrollen resistencia genotípica [20].Las células resistentes crecen en presencia de niveles elevados de concentración antibiótica, que se manifiesta como un aumento en la concentración mínima inhibitoria (MIC), en cambio, los persistentes no tienen ningún efecto sobre la MIC, ya que estas células están en latencia y para matarlas, los antibióticos requieren objetivos activos (células en crecimiento exponencial), lo que explica la tolerancia. Esto muestra a este fenotipo como una importante primera línea de defensa contra los antibióticos antes de que se adquiera la resistencia antimicrobiana [11,12,23,69].

Explicar la causalidad entre la persistencia y el fracaso antibiótico es todavía un desafío. Un primer informe sobre la relación causa-efecto revela que *P. aeruginosa* aumenta los niveles de persistencia en pacientes con fibrosis quística debido al prolongado tratamiento antibiótico [77]. Del mismo modo, los aislamientos de *C. albicans* en infecciones recurrentes de pacientes inmunocomprometidos, muestran un nivel de tolerancia más alto que los aislamientos de infecciones agudas, por selección de persistentes [78]. Otro estudio muestra que los aislamientos de *E. coli* uropatógena, que a menudo albergan mutaciones de alta persistencia tipo hipA (el primer gen de persistencia descrito *in vitro*), causa la naturaleza crónica de las infecciones recurrentes o se selecciona durante el tratamiento antibiótico a largo plazo [21]. Otra publicación, también relacionada a *E. coli* uropatógena, muestra que elevadas concentraciones de enrofloxacino y ciprofloxacino *in vitro* no tienen una acción eficaz en persistentes bacterianos, que permanecen viables, sin desarrollar colonias y adoptan una morfología filamentosa como una estrategia de adaptación y supervivencia [25].

La persistencia parece ser un fenómeno generalizado, sin embargo, diferentes especies bacterianas parecen tener diferentes capacidades de persistencia *in vitro* e *in vivo*, con distintos grados de dificultad para el tratamiento [20]. Si bien se ha dado mayor atención a la resistencia antimicrobiana, la persistencia o la tolerancia a estos es igualmente importante e incluso mucho más compleja, lo que plantea retos importantes para el tratamiento [37].

5.Estrategias de tratamiento en infecciones bacterianas persistentes

Mientras que las diversas infecciones bacterianas parecen tener distintas capacidades de persistencia y diferentes grados de dificultad para el tratamiento, su curación debería tener distintos enfoques estratégicos indicados, como el tipo de fármaco usado, la terapia combinada, la alteración "despertar" del metabolismo persistente, la potenciación de la actividad antibiótica, la mejora del sistema inmune del huésped y el estado de las células diana. Todos estos factores mediarían un mejor resultado al tratamiento.

Una primera estrategia de tratamiento sería el tipo de fármaco usado y su acción en infecciones bacterianas persistentes. Estudios muestran que la colistina [34], así como los péptidos antimicrobianos catiónicos de arginina o triptófano, tienen un efecto notable en reducir el desarrollo de persistencia en *E. coli* por alteración de la membrana externa y en la erradicación de biopelículas [79]. Recientemente, se divulgó que una pequeña molécula, la TCA1 inhibe la formación de *biofilms* en *M. tuberculosis* y mata persistentes, probablemente al centrarse en la inhibición de la síntesis de la pared celular [80]. Otro fármaco poco convencional en el tratamiento de la tuberculosis es la pirazinamida, que actúa únicamente en persistentes no muertos por medicamentos que solo tienen efecto en *micobacterias* de crecimiento activo, y juegan un papel clave en la reducción de la terapia de 9 a 12 meses, a una de 6 meses. La pirazinamida inhibe la producción de energía, los procesos de transcripción y traducción, recicla ribosomas, degrada la acumulación de proteínas tóxicas bajo estrés y, tal vez, la síntesis de coenzima A, necesaria para la supervivencia de micobacterias persistentes [81,82]. Es importante señalar que la pirazinamida inhibe también al parásito de la malaria en reposo (hipnozoito) en modelos murinos [83] y, a pesar de que existe un creciente interés por el desarrollo de fármacos para persistentes bacterianos, la pirazinamida es el único prototipo de fármaco demostrado, hasta ahora, que mejora el tratamiento de este tipo de infecciones [20].

Actualmente, los medicamentos usados contra el cáncer como la mitomicina C, el cisplatino, así como las antraciclinas, han demostrado ser efectivos como terapia para matar persistentes (al reticular y entrecruzar ADN mientras las células duermen) en diversos patógenos como *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, tanto en condiciones de vida libre como en *biofilms*. Aún no se contrasta su acción en condiciones *in vivo* para curar infecciones bacterianas persistentes y, por ello, su aplicación de uso clínico solo está limitada para tratamientos contra el cáncer [11,35].

Un segundo método de tratamiento sería la terapia combinada. En teoría, podría ser efectiva en persistentes, sin embargo, la combinación de antibióticos a menudo falla en la erradicación completa. Existen informes en *Borrelia burgdorferi* que indican que la combinación de antibióticos contra cultivos en crecimiento (cefoperazona o cefuroxima y doxiciclina) con los antibióticos más potentes en las células que no crecen (daptomicina o daunomicina) tendrían un mejor efecto en persistentes [84]. El uso de medicamentos que no requieren el metabolismo activo para operar, como el caso de la nitrofurantoína, también ha sobresalido como un fuerte candidato al matar persistentes bacaterianos en *Listeria monocytogenes* que quedan vivas por otros antibióticos [85], lo que demuestra que la terapia combinada puede ser un tratamiento eficaz contra la formación de persistentes y, a la vez, retardaría el desarrollo de resistencia antimicrobiana [86], pero las investigaciones aún son limitadas en este contexto.

Un tercer mecanismo para tratar las infecciones persistentes consistiría en "despertar" o alterar el estado metabólico de los persistentes para que puedan responder mejor al tratamiento tradicional. Algunas investigaciones muestran que la adición de azúcares o productos intermedios de la glucólisis como manitol, glucosa, fructosa o piruvato activan rápidamente el metabolismo en persistentes de *E. coli* y responden mejor al tratamiento por aminoglucósidos [23,87] (que tiene una mayor absorción al encontrarse activa la fuerza motriz protónica) pero la desventaja de este tratamiento, es que solo se ha demostrado con este tipo de antibiótico, pero no con otros. Estudios relacionados muestran que el glicerol, fuentes de carbono relativamente menos eficaces y nucleótidos tales como la timidina, también potenciarían la actividad de los aminoglucósidos en persistentes en ensayos *in vitro*, y tal enfoque debe ser validado en modelos animales a futuro [88]. De forma similar, las células persistentes de *P. aeruginosa* también pueden despertarse con la adición de ácido cis-2-decenoico (cis-DA), lo que provoca un estallido en la síntesis de proteínas, para luego ser tratadas con ciprofloxacino [73,89], pero al igual que los estudios anteriores, debería ser validado en modelos animales.

Una cuarta estrategia de tratamiento buscaría mejorar la actividad de los antibióticos por ciertos agentes. Por ejemplo, el uso de aspirina, ibuprofeno o hierro que mejoran la actividad de la pirazinamida en infecciones por *M. tuberculosis* [90,91]. Ciertos estudios expresan que la plata, al producir especies reactivas de oxígeno, mejora la actividad de la vancomicina *in vitro*, como también en la eliminación de biopelículas [92]. Queda por determinar cómo funcionan los compuestos y cómo pueden ser utilizados para el tratamiento mejorado de infecciones persistentes.

Finalmente, un quinto método sería aprovechar el sistema inmune del huésped para controlar los persistentes a través del mejoramiento de la inmunidad innata y adaptativa,

modulación de citoquinas y vacunas inmunoterapéuticas que incluyan antígenos de ambas células, en crecimiento y células no crecientes (células persistentes) [20].

El redescubrimiento de persistentes y la intrigante posibilidad de que estos sean los principales culpables de infecciones crónicas y recurrentes, renovó el interés por comprender la naturaleza de estas células inusuales. Los principales conocimientos generados en persistencia bacteriana, sobre su fisiología, mecanismos de formación e importancia clínica, así como las estrategias de tratamiento, hasta el momento, son temas de investigación que requieren de equipos multidisciplinarios para lograr comprender mejor este fenómeno. Su naturaleza transitoria, las distintas hipótesis planteadas sobre su formación, fisiología, vínculo con infecciones recurrentes y el nexo con la resistencia antibiótica son todavía, en muchos casos, causa de confusión.

Los distintos experimentos que plantean los mecanismos de formación, como los que hemos expuesto (módulos toxina-antitoxina, señales SOS, (p)ppGpp, señales de estrés ambiental, los procesos deterministas, como la edad celular y la detección de *quorum*) tienen un enfoque orientador que trata de explicar su formación y su evolución en las enfermedades persistentes, sin embargo, los estudios aún son limitados, debido que la formación de persistentes entre uno y otro grupo bacteriano es de naturaleza heterogénea y solo ha sido demostrado *in vitro*, o, en algunos casos, *in vivo* (en modelos experimentales animales). Faltan todavía muchas más investigaciones que muestren y expliquen qué otros factores o mecanismos ayudan a su formación, la posibilidad de revertir el cambio de fenotipo (de latente a normal) y que sirvan como evidencia sustentable para aumentar su relevancia clínica y comprender mejor la actual crisis antibiótica.

La persistencia impone una carga significativa a la atención de salud pública, no solo en infecciones relacionadas con biopelículas, sino también en otras infecciones donde los patógenos están protegidos del sistema inmune, lo que ocasiona la naturaleza crónica, e incluso incurable, de muchas infecciones. Hasta el momento, la investigación que relaciona la persistencia bacteriana con enfermedades crónicas, recurrentes y la formación de *biofilms*, está limitada a algunos grupos bacterianos de importancia clínica. En este contexto, la posibilidad de que las bacterias persistentes sean la etiología de las enfermedades crónicas, que estas constituyan reservorios biológicos de las recidivas y que a partir de ellas podrían emerger mutantes resistentes, destaca la importancia de revolucionar las prácticas clínicas, los métodos de diagnóstico y la necesidad de desarrollar en un futuro nuevos antibióticos para erradicar esta subpoblación bacteriana tolerante.

Contribuciones de los autores: Danny Omar Suclupe Campos participó en la idea original, redacción de manuscrito y elaboración de figuras; Franklin R. Aguilar Gamboa, en la redacción y revisión crítica del manuscrito.

Fuente de financiamiento: Este artículo ha sido financiado por los autores.

Conflictos de interés: Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45 (4): 999–1007.
2. Balaban NQ, Merrin J, Chait R, Kowalik L, Leibler S. Bacterial persistence as a phenotypic switch. Science. 2004; 305(5690): 1622–5.
3. Fisher RA, Gollan B, Helaine S. Persistent bacterial infections and persister cells. Nat Rev Microbiol. 2017; 15 (8): 453–64.
4. Cui P, Xu T, Zhang WH, Zhang Y. Molecular mechanisms of bacterial persistence and phenotypic antibiotic resistance. Yi Chuan. 2016; 38 (10): 859–71.
5. Möker N, Dean CR, Tao J. Pseudomonas aeruginosa increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. J Bacteriol. 2010; 192 (7): 1946–55.
6. Kussell E, Kishony R, Balaban NQ, Leibler S. Bacterial persistence: a model of survival in changing environments. Genetics. 2005 Apr; 169 (4): 1807–14.
7. Dhar N, McKinney JD. Microbial phenotypic heterogeneity and antibiotic tolerance. Curr Opin Microbiol. 2007; 10 (1): 30–8.
8. Fauvart M, De Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. J Med Microbiol. 2011; 60 (6): 699–709.
9. Hobby GL, Meyer K, Chaffee E. Observations on the Mechanism of Action of Penicillin. Proc Soc Exp Biol Med. 1942; 50 (2): 281–5.
10. Bigger JW. Treatment of Staphylococcal Infections with Penicillin by Intermittent Sterilisation. The Lancet. modificar por 1994; 244(6320): 497-500.
11. Van Den Bergh B, Fauvart M, Michiels J. Formation, physiology, ecology, evolution and clinical importance of bacterial persisters. FEMS Microbiol Rev. 2017; 41 (3): 219–51.
12. Lewis K. Persister Cells. Annu Rev Microbiol. 2010; 64 (1): 357–72.
13. Chain E, Duthie ES. Bactericidal and bacteriolytic action of penicillin on the Staphylococcus. The Lancet. 1945; 245 (6352): 652–7.
14. Amato SM, Fazen CH, Henry TC, Mok WWK, Orman MA, Sandvik EL, et al. The role of metabolism in bacterial persistence. Front Microbiol. 2014; 5 (70): 70.
15. Moyed HS, Bertrand KP. hipA, a newly recognized gene of Escherichia coli K-12 that affects frequency of persistence after inhibition of murein synthesis. J Bacteriol. 1983; 155 (2): 768–75.
16. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. J Biosci. 2008; 33 (5): 795–805.
17. Wood TK, Knabel SJ, Kwan BW. Bacterial persister cell formation and dormancy. Appl Environ Microbiol. 2013; 79 (23): 7116–21.
18. O'Neill J. Tackling a global health crisis: initial steps. The Review on Antimicrobial Resistance. 2015. p 1-22.
19. Van den Bergh B, Michiels JE, Wenseleers T, Windels EM, Boer PV, Kestemont D, et al. Frequency of antibiotic application drives rapid evolutionary adaptation of Escherichia coli persistence. Nat

Microbiol. 2016; 1 (5): 1-7.
20. Zhang Y. Persisters, persistent infections and the Yin-Yang model. Emerg Microbes Infect. 2014; 3 (1): 1-10.
21. Goneau LW, Yeoh NS, MacDonald KW, Cadieux PA, Burton JP, Razvi H, et al. Selective target inactivation rather than global metabolic dormancy causes antibiotic tolerance in uropathogens. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58 (4): 2089-97.
22. Wang T, El Meouche I, Dunlop MJ. Bacterial persistence induced by salicylate via reactive oxygen species. Sci Rep. 2017; 7 (43839): 1-7.
23. Helaine S, Kugelberg E. Bacterial persisters: formation, eradication, and experimental systems. Trends Microbiol. 2014; 22 (7): 417-24.
24. Xu T, Wang XY, Cui P, Zhang YM, Zhang WH, Zhang Y. The Agr quorum sensing system represses persister formation through regulation of phenol soluble modulins in Staphylococcus aureus. Front Microbiol. 2017; 8 (2189): 1-13.
25. Patricelli P, Ramirez E, Presa RC, Dell'Elce A, Formentini E. Efecto de la persistencia bacteriana sobre la eficacia de la enrofloxacina y ciprofloxacina frente a una cepa de Escherichia coli. FAVE- Ciencias Vet. 2017;16 (2017): 30-8.
26. Maisonneuve E, Gerdes K. Molecular mechanisms underlying bacterial persisters. Cell. 2014; 157 (3): 539-48.
27. Kim JS, Wood TK. Tolerant, growing cells from nutrient shifts are not persister cells. MBio. 2017; 8 (2): e 00354-17
28. Kwan BW, Valenta JA, Benedik MJ, Wood TK. Arrested protein synthesis increases persister-like cell formation. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57 (3): 1468-73.
29. Kaldalu N, Hauryliuk V, Tenson T. Persisters-as elusive as ever. Appl Microbiol Biotechnol. 2016; 100 (15): 6545-53.
30. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiol Mol Biol Rev. 2014; 78 (3): 510-43.
31. Orman MA, Brynildsen MP. Dormancy is not necessary or sufficient for bacterial persistence. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57 (7): 3230-9.
32. Trastoy R, Manso T, Fernández-García L, Blasco L, Ambroa A, Pérez del Molino ML, et al. Mechanisms of bacterial tolerance and persistence in the gastrointestinal and respiratory environments. Clin Microbiol Rev. 2018; 31 (4): e 00023-18
33. Torrey HL, Keren I, Via LE, Lee JS, Lewis K. High persister mutants in Mycobacterium tuberculosis. PLoS One. 2016;11(5):1-28.
34. Dörr T, Vulić M, Lewis K. Ciprofloxacin causes persister formation by inducing the TisB toxin in Escherichia coli. PLoS Biol. 2010; 8 (2): 29-35.
35. Kim JS, Wood TK. Persistent persister misperceptions. Front Microbiol. 2016; 7 (2134): 1-7.
36. Singh R, Ray P, Das A, Sharma M. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated Staphylococcus aureus: an in vitro study. J Med Microbiol. 2009; 58 (8): 1067-73.
37. Zhang Y, Yew WW, Barer MR. Targeting persisters for tuberculosis control. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56 (5): 2223-30.
38. Pu Y, Zhao Z, Li Y, Zou J, Ma Q, Zhao Y, et al. Enhanced efflux activity facilitates drug tolerance in dormant bacterial cells. Mol Cell. 2016; 62 (2): 284-94.
39. Prax M, Bertram R. Metabolic aspects of bacterial persisters. Front Cell Infect Microbiol. 2014; 4 (148): 1-6.
40. Glover WA, Yang Y, Zhang Y. Insights into the molecular basis of L-form formation and survival in Escherichia coli. PLoS One. 2009; 4 (10): e 7316.
41. Han J, He L, Shi W, Xu X, Wang S, Zhang S, et al. Glycerol uptake is important for L-form formation and persistence in Staphylococcus aureus. PLoS One. 2014 Sep 24; 9 (9): e 108325.
42. Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in Escherichia coli by toxin-antitoxin systems. Nat Rev Microbiol. 2011; 9 (11): 779-90.
43. Ramage HR, Connolly LE, Cox JS. Comprehensive functional analysis of Mycobacterium tuberculosis toxin-antitoxin systems: implications for pathogenesis, stress responses, and evolution. PLoS Genet. 2009; 5 (12): e 1000767.
44. Fasani RA, Savageau MA. Molecular mechanisms of multiple toxin-antitoxin systems are coordinated to govern the persister phenotype. Proc Natl Acad Sci. 2013; 110 (27): e 2528-37.
45. Schumacher MA, Piro KM, Xu W, Hansen S, Lewis K, Brennan RG. Molecular Mechanisms of HipA-Mediated Multidrug Tolerance and Its Neutralization by HipB. Science. 2009; 323 (5912): 396-401.
46. Korch SB, Henderson TA, Hill TM. Characterization of the hipA7 allele of Escherichia coli and evidence that high persistence is governed by (p)ppGpp synthesis. Mol Microbiol. 2003; 50 (4): 1199-213.
47. Harms A, Stanger FV, Scheu PD, de Jong IG, Goepfert A, Glatter T, et al. Adenylylation of Gyrase and Topo IV by FicT Toxins Disrupts Bacterial DNA Topology. Cell Rep. 2015; 12 (9): 1497-507.
48. Helaine S, Cheverton AM, Watson KG, Faure LM, Matthews SA, Holden DW. Internalization of Salmonella by macrophages induces formation of nonreplicating persisters. Science. 2014; 343 (6167): 204-8.
49. Wagner EG, Unoson C. The toxin-antitoxin system TisB-IstR1: Expression, regulation and biological role in persister phenotypes. RNA Biol. 2012; 9 (12): 1513-9.
50. Marquina Díaz D, Santos de la Sen A. Sistemas de quorum sensing en bacterias. Reduca (Biología) Ser Microbiol. 2010; 3 (5): 39-55.
51. Barreto AC. Quorum Sensing: Sistemas de comunicación bacteriana. Cienc Actual. 2013; 2 (1): 43-50.
52. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. J Bacteriol. 1994; 176 (2): 269-75.
53. Ng WL, Bassler BL. Bacterial quorum-sensing network architectures. Annu Rev Genet. 2009; 43:197-222.
54. Nealson KH, Hastings JW. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. Microbiol Rev. 1979 Dec; 43 (4): 496-518.
55. Schertzer JW, Boulette ML, Whiteley M. More than a signal: non-signaling properties of quorum sensing molecules. Trends Microbiol. 2009; 17 (5): 189-95.
56. Que YA, Hazan R, Strobel B, Maura D, He J, Kesarwani M, et al. A quorum sensing small volatile molecule promotes antibiotic tolerance in bacteria. PLoS One. 2013; 8 (12): e 80140.
57. Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. Nat Chem Biol. 2012; 8 (5): 431-3.
58. Potrykus K, Cashel M. (p)ppGpp: still magical? Annu Rev Microbiol. 2008; 62: 35-51.
59. Liu K, Bittner AN, Wang JD. Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. Curr Opin Microbiol. 2015; 24: 72-9.
60. Liu H, Xiao Y, Nie H, Huang Q, Chen W. Influence of (p)ppGpp on biofilm regulation in Pseudomonas putida KT2440. Microbiol Res. 2017; 204: 1-8.
61. Vogt SL, Green C, Stevens KM, Day B, Erickson DL, Woods DE, et al. The Stringent Response Is Essential for Pseudomonas aeruginosa Virulence in the Rat Lung Agar Bead and Drosophila melanogaster Feeding Models of Infection. Infect Inmmun. 2011; 79 (10): 4094-104.
62. Syal K, Chatterji D. Differential binding of ppGpp and pppGpp to E. coli RNA polymerase: photo-labeling and mass spectral studies. Genes Cells. 2015; 20 (12): 1006-16.
63. Germain E, Roghanian M, Gerdes K, Maisonneuve E. Stochastic induction of persister cells by HipA through (p)ppGpp-mediated activation of mRNA endonucleases. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015;

112 (16): 5171-6.
64. Harms A, Maisonneuve E, Gerdes K. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. Science. 2016
65. Bernier SP, Lebeaux D, DeFrancesco AS, Valomon A, Soubigou G, Coppée J-Y, et al. Starvation, together with the SOS response, mediates high biofilm-specific tolerance to the fluoroquinolone ofloxacin. PLoS Genet. 2013; 9 (1): e 1003144
66. Nguyen D, Joshi-Datar A, Lepine F, Bauerle E, Olakanmi O, Beer K, et al. Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. Science. ; 334 (6058): 982-6.
67. Wu J, Xie J. Magic spot: (p) ppGpp. J Cell Physiol. 2009; 220 (2): 297-302.
68. Van Delden C, Comte R, Bally AM. Stringent response activates quorum sensing and modulates cell density-dependent gene expression in Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol. 2001; 183 (18): 5376-84.
69. Lewis K. Persister Cells and the Paradox of Chronic Infections. Microbe Mag. 2010; 5 (10): 429-37.
70. Jayaraman R. Bacterial persistence: some new insights into an old phenomenon. J Biosci. 2008; 33 (5): 795-805.
71. Rhen M, Eriksson S, Clements M, Bergström S, Normark SJ. The basis of persistent bacterial infections. Trends Microbiol. 2003; 11 (2): 80-6.
72. Casellas JM. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. Rev Panam Salud Pública. 2011;30 (6): 519-28.
73. Wood TK. Strategies for combating persister cell and biofilm infections. Microb Biotechnol. 2017;10 (5): 1054-6.
74. Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010; 8 (9): 623-33.
75. Henry TC, Brynildsen MP. Development of Persister-FACSeq: a method to massively parallelize quantification of persister physiology and its heterogeneity. Sci Rep. 2016; 6: 25100.
76. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. Asaio J. 2000; 46 (6): S 47-52.
77. Moker N, Dean CR, Tao J. Pseudomonas aeruginosa increases formation of multidrug-tolerant persister cells in response to quorum-sensing signaling molecules. J Bacteriol. 2010; 192 (7):1946-55.
78. LaFleur MD, Qi Q, Lewis K. Patients with long-term oral carriage harbor high-persister mutants of Candida albicans. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54 (1): 39-44.
79. Bahar AA, Liu Z, Totsingan F, Buitrago C, Kallenbach N, Ren D. Synthetic dendrimeric peptide active against biofilm and persister cells of Pseudomonas aeruginosa. Appl Microbiol Biotechnol. 2015; 99 (19): 8125-35.
80. Wang F, Sambandan D, Halder R, Wang J, Batt SM, Weinrick B, et al. Identification of a small molecule with activity against drug-resistant and persistent tuberculosis. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013; 110 (27): E2510-7.
81. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. Science. 2011; 333 (6049): 1630-2.
82. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. Int J Tuberc Lung Dis. 2003; 7 (1): 6-21.
83. Deye GA, Gettayacamin M, Hansukjariya P, Im-erbsin R, Sattabongkot J, Rothstein Y, et al. Use of a rhesus Plasmodium cynomolgi model to screen for anti-hypnozoite activity of pharmaceutical substances. Am J Trop Med Hyg. 2012 Jun; 86 (6): 931-5.
84. Feng J, Weitner M, Shi W, Zhang S, Zhang Y. Eradication of Biofilm-Like Microcolony Structures of Borrelia burgdorferi by Daunomycin and Daptomycin but not Mitomycin C in Combination with Doxycycline and Cefuroxime. Front Microbiol. 2016; 7:62.
85. Knudsen GM, Ng Y, Gram L. Survival of bactericidal antibiotic treatment by a persister subpopulation of Listeria monocytogenes. Appl Environ Microbiol. 2013; 79 (23): 7390-7.
86. Kim S, Lieberman TD, Kishony R. Alternating antibiotic treatments constrain evolutionary paths to multidrug resistance. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014; 111 (40): 14494-9.
87. Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. Nature. 2011; 473 (7346): 216-20.
88. Orman MA, Brynildsen MP. Establishment of a method to rapidly assay bacterial persister metabolism. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57 (9): 4398-409.
89. Marques CNH, Morozov A, Planzos P, Zelaya HM. The Fatty Acid Signaling Molecule cis-2-Decenoic Acid Increases Metabolic Activity and Reverts Persister Cells to an Antimicrobial-Susceptible State. Appl Environ Microbiol. 2014; 80 (22): 6976-91.
90. Byrne ST, Denkin SM, Zhang Y. Aspirin and ibuprofen enhance pyrazinamide treatment of murine tuberculosis. J Antimicrob Chemother. 2007; 59 (2): 313-6.
91. Somoskovi A, Wade MM, Sun Z, Zhang Y. Iron enhances the antituberculous activity of pyrazinamide. J Antimicrob Chemother. 2004; 53 (2): 192-6.
92. Morones-Ramirez JR, Winkler JA, Spina CS, Collins JJ. Silver Enhances Antibiotec Activity Against Gram-Negative Bacteria. Sci Transl Med. 2013; 5 (190): 1-11.

Correspondencia:
Franklin Rómulo Aguilar-Gamboa
Dirección: Av. Vía de Evitamiento Norte con Av. El Progreso. Chiclayo, Perú.
Teléfono: (+51) 971339765
Correo electrónico: Krause_86@hotmail.com

Recibido: 21 de diciembre de 2018
Evaluado: 06 de febrero de 2019
Aprobado: 12 de febrero de 2019

© La revista. Publicado por Universidad de San Martín de Porres, Perú. Licencia de Creative Commons Artículo en acceso abierto bajo términos de Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional. (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

ORCID iDs
Danny-Omar Suclupe-Campos https://orcid.org/0000-0003-4930-3689
Franklin-Rómulo Aguilar-Gamboa https://orcid.org/0000-0003-1943-5613