



EDITORIAL

Persiste y triunfarás: células persistentes en biofilm microbianos



Persist and triumph: persistent cells in microbial biofilm

María Gabriela Paraje

Universidad Nacional de Córdoba (UNC), Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales, Cátedra de Microbiología. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV), Córdoba, Argentina

“*Nihil novum sub sole (nada nuevo bajo el sol)*”
Eclesiastés

El fenómeno de persistencia no es nuevo. Fue descrito por primera vez en 1944 por Joseph Bigger al comprobar que en cultivos planctónicos de *Staphylococcus aureus* tratados con penicilina, una pequeña población (1/10 000 a 1/1 000 000) sobrevivía a sucesivos tratamientos². Sin embargo, el interés por el estudio de esta población persistente tendría un nuevo impulso en la década de los 80, cuando Moyed et al., 1983, las identificaron en cepas de *Escherichia coli* tratadas con ampicilina. Dado que dichas células estaban presentes entre 10 a 10 000 veces más que en la cepa de *E. coli wild type* (WT), las llamaron mutantes *high persister* (hip)⁷. Estudios posteriores permitieron identificar al primer gen ligado al fenómeno de persistencia, *hipA*, quien codifica la toxina HipA que, junto con la antitoxina HipB forman un módulo toxina-antitoxina⁴. Sin embargo, aún no ha sido posible aislar cepas con el gen defectivo *hipA* incapaces de generar células persistentes (*persister cells*), indicando la importancia de la regulación de los genes involucrados en este fenómeno.

Correos electrónicos: gparaje@unc.edu.ar,
gabrielaparaje@gmail.com

Actualmente a las células persistentes se las define como una subpoblación menor al 1% de células isogénicas. Muchos microorganismos, incluidas bacterias y levaduras son capaces de producir células persistentes en cultivos planctónicos y en *biofilm* (biopelículas). La persistencia es un concepto distinto a la resistencia, ya que el/los factor/es genético/s que las hace/n a persistir a altas concentraciones de antimicrobianos son provocados debido a variaciones fisiológicas no heredables a la progenie. Contrariamente, la resistencia es genéticamente estable, dando origen a una población de células completamente resistentes, y siendo necesarias dosis mayores de antimicrobianos para eliminarlas, con el consecuente incremento en la concentración inhibitoria mínima (CIM). En el fenómeno de persistencia, una vez que la presión del antimicrobiano cesa, se genera una población con la misma sensibilidad a la original, siendo variaciones fenotípicas transitorias del tipo WT, es decir, se mantiene mientras exista presión antimicrobiana. Esto significa que las células persistentes son susceptibles al mismo antimicrobiano, con iguales valores de CIM que las células planctónicas originales^{4,5}.

Diversos trabajos de investigación demostraron que el fenómeno de persistencia se manifiesta tanto en la forma de vida planctónica como en el *biofilm*. La presencia de estas poblaciones persistentes puede ser estudiada, de forma

<https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.07.001>

0325-7541/© 2018 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Asociación Argentina de Microbiología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

relativamente sencilla, mediante curvas de muerte dosis-dependiente. De esta manera, se observaría una curva de muerte bifásica característica con dos pendientes diferentes. La primera, abrupta, con un pronunciado descenso en el recuento de células viables como consecuencia de la eliminación de las células (planctónicas o sésiles regulares) que son sensibles al antimicrobiano. Posteriormente, se genera una meseta en el recuento de células viables, correspondiente a una subpoblación de células capaces de sobrevivir al antimicrobiano, es decir, las células persistentes. Spoering et al., 2001, evaluaron la presencia de células persistentes en cultivos planctónicos en fase logarítmica, en fase estacionaria y en *biofilm* de *Pseudomonas aeruginosa* en presencia de distintos antibióticos. Dichos autores observaron que las células en fase logarítmica eran completamente sensibles, mientras que, tanto en cultivos planctónicos —en fase estacionaria— como el *biofilm*, contenían una pequeña fracción de células persistentes⁸.

La relación entre las células persistentes y la recurrencia de las infecciones microbianas crónicas es actualmente motivo de estudio. Según un modelo desarrollado por Lewis, en una infección asociada a *biofilm*, el tratamiento antimicrobiano podría eliminar la mayoría de las células sésiles (regulares) del *biofilm*, también las que se desprendan de esta estructura, y el resto podrían ser eliminadas por el sistema inmune. Sin embargo, las células persistentes que permanecen en el interior o en la base, no se verían afectadas, debido al complejo fenómeno multifactorial de resistencia que brinda el *biofilm* y/o a la imposibilidad del sistema inmune de penetrar en él. Durante el tratamiento, la población microbiana se reduciría enormemente, y junto con ella los síntomas de la infección. Sin embargo, en los casos de infecciones asociadas a *biofilm* o en pacientes con deficiencias en el sistema inmune esto no ocurriría. En este momento, las células persistentes que sobrevivieron en el interior de la estructura del *biofilm* proliferarían formándolo nuevamente, y dando lugar a la reaparición de la infección. También se ha podido demostrar que terapias antimicrobianas prolongadas pueden seleccionar cepas con alta tasa de persistencia (mutantes *hip*), produciendo mayor cantidad de células persistentes, estableciéndose así un vínculo entre el fenómeno de persistencia y las infecciones crónicas altamente recalcitrantes⁴.

Aunque las células persistentes pueden formarse de manera espontánea como consecuencia de variaciones estocásticas en los niveles de expresión genética de las células⁴, existe una gran diversidad de disparadores y mecanismos que pueden inducir este estado de persistencia en un microorganismo. Por ejemplo, el shock térmico induce persistencia a aminoglucósidos en *Acinetobacter baumannii*; la limitación de nutrientes ha sido descrita como un inductor de persistencia en *E. coli* y en *Mycobacterium tuberculosis*; la generación de estrés oxidativo y daño en el ADN causado por peróxido de hidrógeno o dosis sub-letales de antibióticos promueven la formación de células persistentes en *E. coli* y en *P. aeruginosa*. Moléculas de *quorum sensing* como el indol y péptidos alarmonas en *Streptococcus mutans* también han demostrado que pueden actuar como reguladores de la formación de células persistentes. Se ha reportado que en *biofilm* de algunas especies de *Candida* y *Cryptococcus neoformans*, distintas condiciones ambientales, como variaciones en la temperatura y pH, pueden

modificar la fracción de células persistentes y por ende la sensibilidad a los antifúngicos⁹. De esta manera, es evidente que esta formación estaría regulada por diversos factores externos⁵.

Existen sólidas evidencias que han demostrado que las células persistentes son, en gran parte, responsables de las infecciones microbianas crónicas recurrentes asociadas a *biofilm*. La eliminación de células persistentes, podría ser el paso clave para la erradicación de los mismos. Varias investigaciones se han realizado para lograr este objetivo; sin embargo, ningún resultado parece ser altamente eficaz. Una de las estrategias sería reactivar las células persistentes de su estado metabólico y tratar posteriormente a las células reactivadas con un antimicrobiano efectivo. La molécula de señalización de ácidos grasos, ácido cis-2-decenoico (cis-DA), puede cambiar el estado metabólico de *P. aeruginosa* y *E. coli*. La reactivación de las células persistentes mediada por cis-DA coincidieron con un aumento de la respiración y la síntesis de proteínas bacterianas⁶.

Recientes investigaciones demostraron que se puede aumentar la susceptibilidad antimicrobiana cuando se exponen a las células persistentes a un agente osmótico. El tratamiento de *P. aeruginosa* con tobramicina en combinación con manitol aumentó la sensibilidad de las células persistentes a este antibiótico hasta 1000 veces y se pudo revertir el fenotipo persistente como respuesta fisiológica asociada al estrés osmótico¹.

Conlon et al., 2013, describieron otra estrategia para la eliminación de las células persistentes en *biofilm* al utilizar acildepsipéptido (ADEP4) como antibiótico, que activa a una proteasa inespecífica (ClpP) que por lo general causa la muerte de las células en fase exponencial. El tratamiento de *biofilm* de *S. aureus* con ClpP elimina a las células persistentes al degradar más de 400 proteínas. Además, combinando ADEP4 con rifampicina se produce la erradicación completa del *biofilm* de *S. aureus* en un modelo de infección crónica en ratones³.

Aunque ya lo había propuesto Bigger en 1944, la evidencia acumulada en las últimas décadas señala de manera convincente la importancia de las células persistentes, siendo el “talón de Aquiles” de la terapia antimicrobiana, como un factor clave en la reactivación de las infecciones crónicas asociadas a *biofilm* y es por eso que su estudio ha cobrado gran interés.

Bibliografía

1. Barraud N, Buson A, Jarolimek W, Rice SA. Mannitol enhances antibiotic sensitivity of persistenter bacteria in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One*. 2013;8:e84220.
2. Bigger JW. The bactericidal action of penicillin on *Staphylococcus pyogenes*. *Irish J Med Sci*. 1944;19:553–68.
3. Conlon B, Nakayasu E, Fleck L, LaFleur MD, Isabella VM, Coleman K, Leonard SN, Smith RD, Adkins JN. Killing persistenter cells and eradicating a biofilm infection by activating the ClpP protease. *Nature*. 2013;503:365–70.
4. Lewis K. Persistenter Cells. En: Gottesman S, Harwood CS, editors. *Annual Review of Microbiology*, Vol. 64. Palo Alto: Annual Reviews; 2010. p. 357-72.
5. Manavathu EK, Vazquez JA. The functional resistance of biofilms. En: Douglas L, Mayers, Jack D, Sobel, Marc Ouellette, Keith S, Kaye, Dror Marchaim, editors. *Antimicrobial Drug Resistance:*

- Mechanisms of Drug Resistance, Volume 1, 2nd edition Switzerland: Springer International Publishing; 2017. p. 149–63.
6. 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;80:6976–91.
 7. 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;155:768–75.
 8. Spoering AL, Lewis K. Biofilms and planktonic cells of *Pseudomonas aeruginosa* have similar resistance to killing by antimicrobials. *J Bacteriol.* 2001;183:6746–51.
 9. Turan H, Demirbilek M. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. *Rev Argent Microbiol.* 2018;50:62–9.