

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



PERSISTENCIA BACTERIANA INDUCIDA POR ESTRÉS OXIDATIVO EN
Pseudomonas aeruginosa Y *Staphylococcus aureus* Y SU IMPACTO EN LA RESPUESTA
INMUNE INNATA *in vitro*.

POR:

Q.B.P. GUSTAVO AARÓN GARZA HERNÁNDEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN
CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

“Persistencia bacteriana inducida por estrés oxidativo en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* y su impacto en la respuesta inmune innata *in vitro*”

Comité de tesis

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Presidente

Dra. María Cristina Rodríguez Padilla

Secretaria

Dr. Reyes S. Tamez Guerra

Vocal 1

Dra. Itza Eloisa Luna Cruz

Vocal 2

Dr. Jorge Castro Garza

Vocal 3



Dra. Katiushka Arévalo Nino

Subdirectora de Posgrado

“Persistencia bacteriana inducida por estrés oxidativo en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* y su impacto en la respuesta inmune innata *in vitro*”

Dirección de Tesis



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales

Director Interno



Dra. Karla Selene Morán Santibáñez

Director Externo

AVISO DE DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, porque a pesar de mis miedos, dudas y quebrantos, sé que tu diestra me ha sostenido. Porque sé que toda sabiduría y conocimiento proviene de ti, gracias por permitirme completar este proyecto y abrir las puertas para proveerme de los recursos necesarios. Por alentarme aún cuando dudaba de mis habilidades.

A mi familia, especialmente a mis padres, Verónica Cedillo y Gustavo Garza, y mi hermano Josué, por instarme a no rendirme y pensar, por enseñarme el valor del esfuerzo y por confiar más en mí que yo mismo. A mi tía Sandra y mis primos por toda su ayuda en mi vida personal y por sus oraciones.

A mi comité de tesis interno, especialmente a mi directora la Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales, por su confianza en este proyecto y en mi persona, por fomentar mi progreso como investigador; así como a la Dra. Itza Eloisa Luna Cruz y al Dr. Jorge Castro Garza por su asesoramiento y acompañamiento. A la Dra. María Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes S. Tamez Guerra.

A la Dra. Karla Selene Morán Santibáñez, quien fue mi directora externa, por su apoyo y experiencia en el área, así como por su mediación para la donación del material de trabajo empleado en este proyecto.

A Grupo AlEn por la generosa donación del material utilizado durante el desarrollo experimental de esta tesis. Su valioso apoyo fue fundamental para la realización de este proyecto, permitiendo el desarrollo de los ensayos experimentales.

A otros investigadores que me apoyaron e inspiraron durante el desarrollo de esta tesis: al Dr. José Luis Zacarías Hernández por su asesoramiento, a la Dra. Diana E. Caballero y al Dr. José A. Valadez por su orientación en clase; así como a la Dra. Diana G. Zárate y el Dr. Pablo Zapata por prestarme sus equipos de laboratorio e instalaciones.

A mis amigos fuera y dentro del departamento, mis compañeros de generación: Agua Marina Salcedo, Luisa Onofre, Luisa Rendon, Paola Zapata, Rubén Saavedra y Alejandra Guerrero, así como mi compañera de maestría en microbiología Luisa Rodríguez, por acompañarme en todo este proceso, con sus momentos divertidos y estresantes.

A mis amigas Abril, Alexia y Nicol. No hay personas que puedan entender mejor lo que fue desarrollar este proyecto, les agradezco por las risas, regaños y lágrimas que hemos compartido juntos. Gracias por enseñarme lo bueno y lo malo de hacer investigación, gracias por estar a mi lado.

Por último, agradezco a los miembros de la Unidad de Infectología Molecular por su ayuda en el desarrollo de este proyecto, a Azael por compartirme su experiencia y las pláticas en la comida, a Mónica por confiar en mí para su proyecto de investigación y a Alejandra y todos los demás alumnos de servicio social y voluntarios que aligeraban mi carga de trabajo y mejoraban el humor dentro del laboratorio.

GRACIAS.

DEDICATORIA

A Dios, creador de todo, por permitirme estudiar la hermosura de su creación.

A mi abuela Sara y a mis padres. Si alguien me enseñó sobre persistencia, fueron ellos.

Al lector de esta tesis: en un mundo donde incluso las bacterias encuentran formas de sobrevivir, adaptarse y persistir, quizá nosotros también podamos hacerlo. Espero que aprendamos a hacerlo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. ANTECEDENTES	5
2.1 Infecciones bacterianas persistentes	5
2.1.1 Infecciones crónicas, recurrentes y subclínicas	5
2.1.2 Infecciones causadas por el grupo ESKAPE: impacto clínico	6
2.2 Estrés ambiental y respuestas de adaptación bacteriana	8
2.2.1 Resistencia y tolerancia bacteriana	8
2.2.2 Persistencia bacteriana	10
2.2.3 Estrés como inductor de persistencia bacteriana	11
2.3 Interacción entre bacterias persistentes y la respuesta inmune innata	12
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 OBJETIVO GENERAL	19
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Aislamiento e identificación	20
6.1.1 Resiembra de las cepas clínicas	20
6.1.2 Tinciones y pruebas bioquímicas	20
6.2 Inducción de células persistentes en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	21
6.2.1 Cloración	22
6.2.2 Ensayos de viabilidad bacteriana	22

6.3 Efecto del suero humano en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> persistentes	24
6.4 Interacción entre macrófagos y <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> persistentes	25
6.4.1 Mantenimiento de macrófagos RAW 264.7.....	25
6.4.2 Infección con <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> persistentes.	26
6.4.3 Cambios morfológicos y producción de óxido nítrico.....	27
7. RESULTADOS	28
7.1 Efecto del estrés oxidativo en la inducción de persistencia bacteriana	28
7.2 La persistencia disminuye la susceptibilidad al sistema de complemento humano en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	32
7.3 El estado persistente favorece la supervivencia intracelular <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> en macrófagos murinos RAW 264.7.....	35
8. DISCUSIÓN	41
9. CONCLUSIONES.....	47
10. PERSPECTIVAS.....	48
10. ANEXOS.....	49
11. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Clasificación de infecciones	5
Figura 2. Panorama epidemiológico IAAS en México (Octubre 2025)	7
Figura 3. Patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, 2024.....	8
Figura 4. Diferentes susceptibilidades bacterianas a los antibióticos	10
Figura 5. El papel del estrés oxidativo en diferentes modelos de persistencia bacteriana..	12
Figura 6. Persistencia bacteriana y respuesta inmune innata	13
Figura 7. Patogenicidad de <i>Staphylococcus aureus</i> VBNC	15
Figura 8. Ensayo de cloración y viabilidad bacteriana	24
Figura 9. Ensayo de actividad de complemento	25
Figura 10. Ensayo de infección de macrófagos.....	26
Figura 11. Ensayo de activación oxidativa NBT.	27
Figura 12. Efecto del estrés oxidativo sobre <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Figura 13. Efecto del estrés oxidativo sobre <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30
Figura 14. Viabilidad residual de las cepas tras el estrés oxidativo.....	31
Figura 15. Efecto del suero humano en la viabilidad de <i>Staphylococcus aureus</i> persistente	32
Figura 16. Efecto del suero humano en la viabilidad de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> persistente.....	33
Figura 17. Supervivencia intracelular de bacterias persistentes en macrófagos	37
Figura 18. Efecto de la persistencia bacteriana sobre la activación de macrófagos RAW 264.7.....	39
Figura 19. Modelos propuestos de supervivencia de <i>S. aureus</i> y <i>P. aeruginosa</i> persistentes	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Ejemplos de especies bacterianas causantes de infecciones persistentes.	6
Tabla 2. Coeficientes de extinción molar de la resazurina.	23

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
h	Horas
IFN- γ	Interferón gamma
MDR	Multidrogorresistente
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MOI	Multiplicidad de infección
nm	Nanómetros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
pH	Potencial de hidrógeno
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
ppm	Partes por millón
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
SD	Desviación estándar
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias por mililitro
v/v	Volumen por volumen
ϵ	Coeficiente de extinción molar
μ L	Microlitros
μ M	Micromolar

RESUMEN

El incremento de infecciones causadas por bacterias multirresistentes representa un importante problema de salud pública; en el ámbito hospitalario, patógenos como el grupo ESKAPE favorecen infecciones y brotes recirculantes. Este fenómeno se ha relacionado con el desarrollo de estados de tolerancia antimicrobiana, o persistencia bacteriana, los cuales se creen permiten la evasión de la respuesta inmune y recurrencia de infecciones, resaltando la necesidad de profundizar en su estudio para mejorar estrategias de diagnóstico y control.

Objetivo. Evaluar el impacto del estado persistente en la respuesta inmune innata desencadenada por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. **Métodos.** Se utilizaron cepas clínicas MDR y cepas ATCC de *P. aeruginosa* y *S. aureus*. La persistencia fue inducida mediante NaClO (6 y 10 ppm). La viabilidad se evaluó mediante resazurina y recuento de UFC, buscando curvas bifásicas de muerte como criterio de persistencia. Posteriormente, se analizó la susceptibilidad al sistema de complemento utilizando suero humano. Se estableció un modelo de infección *in vitro* utilizando macrófagos RAW 264.7 infectados con bacterias basales y persistentes a una MOI de 5. La supervivencia intracelular se determinó mediante recuperación de UFC tras lisis celular y la activación oxidativa de los macrófagos se evaluó mediante nitroazul de tetrazolio (NBT). **Resultados.** La exposición al NaClO produjo una disminución de la viabilidad bacteriana en los primeros 30 minutos, seguida de una fase de meseta en *S. aureus* y *P. aeruginosa*. En el ensayo con suero humano, *S. aureus* mostró alta tolerancia al complemento, mientras que la persistencia protegió a *P. aeruginosa* en menor medida. Asimismo, las poblaciones persistentes tendieron a mantener o incrementar su actividad metabólica en condiciones de suero inactivado. Las persistentes mantienen niveles de interiorización en los macrófagos similares a las bacterias basales; sin embargo, presentan una mayor supervivencia intracelular tras la fagocitosis. Los ensayos de NBT sugieren una mayor activación del estallido respiratorio frente a bacterias persistentes, paradójicamente favoreciendo su permanencia intracelular. **Conclusiones.** El estrés oxidativo inducido por NaClO favorece la formación de persistentes, este estado parece favorecer la supervivencia ante el sistema de complemento; así como la supervivencia intracelular en macrófagos. Estos hallazgos sugieren que la persistencia bacteriana podría contribuir a la evasión inmunológica y a la recurrencia de infecciones.

ABSTRACT

The increase in infections caused by multidrug-resistant bacteria represents a major public health problem. In hospital settings, pathogens such as the ESKAPE group promote healthcare-associated infections and recurrent outbreaks. This phenomenon has been associated with the development of transient states of antimicrobial tolerance, known as bacterial persistence, which are linked to immune response evasion and recurrent infections, highlighting the need for further research to improve diagnostic and control strategies.

Objective. To evaluate the impact of the persistent state on the innate immune response triggered by *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. **Methods.** MDR clinical strains and ATCC strains of *P. aeruginosa* and *S. aureus* were used. Persistence was induced using NaClO (6 and 10 ppm). Bacterial viability was assessed by resazurin assay and CFU counting, searching for biphasic killing curves as a persistence criteria. Subsequently, susceptibility to the complement system was analyzed using human serum. Finally, an *in vitro* infection model was established using RAW 264.7 macrophages infected with basal and persistent bacteria at an MOI of 5. Intracellular survival was determined by CFU recovery after cell lysis, while macrophage oxidative activation was evaluated using nitroblue tetrazolium (NBT). **Results.** Exposure to NaClO produced a decrease in bacterial viability during the first 30 minutes, followed by a plateau phase in *S. aureus* and *P. aeruginosa*. In the human serum assay, *S. aureus* showed high complement tolerance, whereas persistence provided lower protection to *P. aeruginosa*. Persistent populations also tended to maintain or increase their metabolic activity under heat-inactivated serum conditions. Persistent bacteria maintained macrophage internalization levels similar to basal bacteria; however, they exhibited greater intracellular survival after phagocytosis. NBT assays suggested increased respiratory burst activation against persistent bacteria, paradoxically favoring their intracellular persistence. **Conclusions.** Oxidative stress induced by NaClO promotes the formation of persisters, and this state appears to favor survival against the complement system as well as intracellular survival within macrophages. These findings suggest that bacterial persistence may contribute to immune evasion and the recurrence of chronic or subclinical infections.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los mayores retos actuales en materia de salud pública es el aumento de casos de infecciones causadas por patógenos que presentan resistencia a diversos agentes antimicrobianos, encontrando microorganismos especialmente notorios por su capacidad de sobrevivir en el entorno hospitalario y generar brotes recirculantes intrahospitalarios (Flores-Paredes et al. 2021).

Esta capacidad de supervivencia en hospitales puede agravar la transmisión de agentes resistentes a antibióticos, propiciando así la aparición de infecciones asociadas a la atención de la salud (IAAS); particularmente de aquellos organismos pertenecientes al grupo ESKAPE: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* (Flores-Paredes et al. 2021; Zumaya-Estrada et al. 2021).

Bajo este contexto, se estima que la mortalidad anual asociada a la resistencia a antibióticos alcance los 10 millones de defunciones para el 2050. Aunado a esto, debido a la pandemia causada por el COVID-19 y el uso excesivo de antimicrobianos en respuesta a coinfecciones, se espera que esta tasa aumente considerablemente (de Oliveira Santos et al. 2022; Loyola-Cruz et al. 2023).

Sin embargo; el aumento de casos de brotes recirculantes sigue siendo un problema multifactorial. Muchas bacterias tienen la capacidad de infectar y persistir dentro de sus hospederos durante largos períodos de tiempo, esto puede deberse a la inmunosupresión del paciente, una posible evasión inmune por parte del patógeno y/o a la supervivencia ante un tratamiento antimicrobiano ineficaz (Fisher et al. 2017a). Las bacterias sobrevivientes pueden ser resistentes o tolerantes al tratamiento. La persistencia es un estado transitorio bacteriano en el cual una subpoblación adquiere una tolerancia temporal al tratamiento. A menudo, estas bacterias dejan de multiplicarse o reducen su tasa de crecimiento y lo reanudan después del estrés letal (Niu et al. 2024).

La diversidad fenotípica de células persistentes ha favorecido encontrar diferentes subpoblaciones de una misma cepa bacteriana con distintas capacidades para adaptarse con éxito a los cambios ambientales, por lo que este estado se ha relacionado con la reaparición

de brotes, una mayor capacidad de evadir la respuesta inmune, así como un aumento de la resistencia a antibióticos (Kaldalu et al. 2020; Niu et al. 2024).

El enmascaramiento y heterogeneidad de las bacterias persistentes, aunado a la poca investigación referente, a conllevado a subestimar la carga bacteriana presente en ambientes hospitalarios, así como sus implicaciones en infecciones subclínicas; por lo que comprender los mecanismos de evasión inmunológica asociados a fenotipos persistentes aportará información clave para el diseño de nuevas estrategias de diagnóstico y control (Gollan et al. 2019).

2. ANTECEDENTES

2.1 Infecciones bacterianas persistentes

2.1.1 Infecciones crónicas, recurrentes y subclínicas

En condiciones óptimas, una infección bacteriana es controlada cuando el sistema inmune del hospedero la elimina o el tratamiento antimicrobiano tiene efecto. No obstante, en ciertos casos la bacteria es capaz de eludir al sistema inmune y multiplicarse, prolongando la infección, lo cual puede conllevar a lo que conocemos como infección crónica; o bien, provocar una infección subclínica, usualmente asintomática, pero con la posibilidad de reactivarse después de un largo período de tiempo, convirtiéndose en una enfermedad clínicamente significativa (Fisher et al. 2017a; Grant and Hung 2013).

Existen varios factores que contribuyen al surgimiento de infecciones persistentes, incluyendo la resistencia a los antibióticos y la inmunosupresión del hospedero. Esta combinación de factores conduce a la aparición de episodios continuos o recurrentes de infecciones bacterianas (Figura 1).

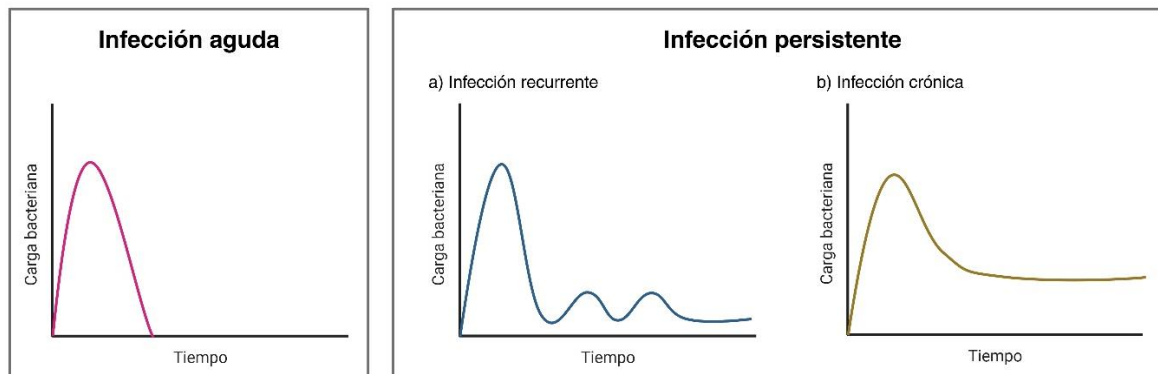


Figura 1. *Clasificación de infecciones*

Las infecciones pueden clasificarse según el tiempo de infección y la carga bacteriana en aguda y persistente. Las infecciones agudas (izq) presentan una resolución completa tras un pico inicial de crecimiento; mientras que las infecciones persistentes (der) pueden manifestarse como a) infecciones recurrentes (con episodios de reactivación) o b) infecciones crónicas. Fuente: Elaboración propia.

Las infecciones persistentes asintomáticas no se diagnostican regularmente y pueden ser causadas por bacterias en crecimiento o cuyo crecimiento esté detenido; sin embargo, cuando una infección persistente es causada por una bacteria en crecimiento activo no sólo es capaz de reactivarse dentro del huésped, sino que también pueden propagarse a otros y causar enfermedades (Fisher et al. 2017a; Grant and Hung 2013).

2.1.2 Infecciones causadas por el grupo ESKAPE: impacto clínico

Existe una diversidad de especies bacterianas cuyos mecanismos de virulencia les permiten causar infecciones persistentes (Tabla 1). Estos organismos son patógenos críticos en personas inmunosuprimidas, por lo que el entorno hospitalario adquiere un papel importante en el desarrollo de las infecciones persistentes, ya que este funciona como un importante reservorio de patógenos (Loyola-Cruz et al. 2023).

Estos microorganismos intrahospitalarios son aislados de superficies inertes, dispositivos médicos e inclusive en el mismo personal de atención médica. A estas infecciones generadas durante la estancia hospitalaria o posterior a la estancia de un paciente se le conoce como infección asociada a la atención de la salud (IAAS) (Loyola-Cruz et al. 2023)

Tabla 1. Ejemplos de especies bacterianas causantes de infecciones persistentes.

Sitio de infección	Especies asociadas	Tipo de infección persistente	Mecanismos bacterianos
Respiratorio	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Burkholderia cepacia</i>	Infecciones sintomáticas y asintomáticas (activas o latentes)	Crecimiento intracelular, formación de biopelícula, variantes de colonias pequeñas, células persistentes
Gastrointestinal	<i>Helicobacter pylori</i> <i>Brucella abortus</i> <i>Clostridium difficile</i>		
Sistemático	<i>Salmonella enterica</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus pyogenes</i>		

Adaptado de Fisher et al. 2017; Grant and Hung 2013.

En México, las IAAS son un problema de salud pública importante debido a su frecuencia, morbilidad y mortalidad que provocan. De acuerdo con los datos obtenidos por la Red Hospitalaria Epidemiológica (RHOVE) a octubre de 2025 se notificaron un total de 104275 IAAS en el país, siendo *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*, los principales 3 organismos identificados causantes de estas patologías (RHOVE 2025) (Figura 2).

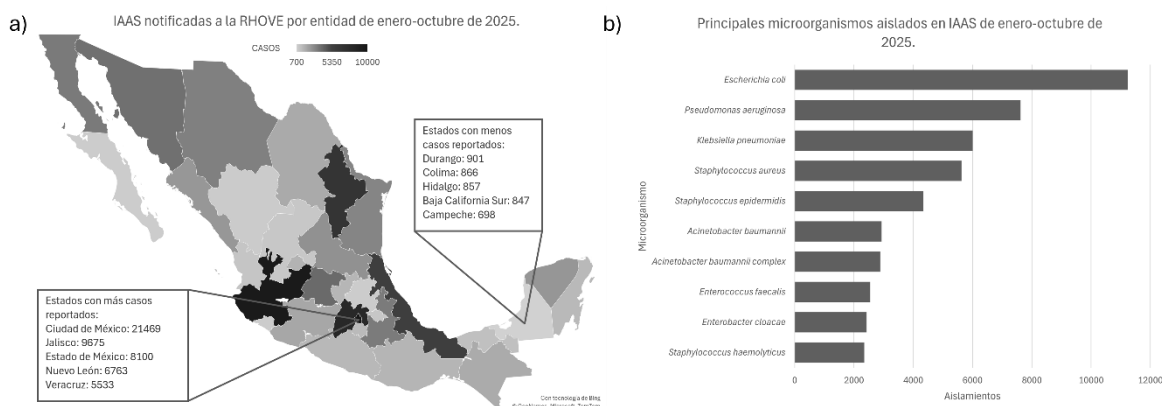


Figura 2. Panorama epidemiológico IAAS en México (Octubre 2025)

A) Mapa correspondiente al número de IAAS reportadas por la RHOVE por entidad federativa. B) Principales microorganismos aislados en IAAS de enero a octubre del 2025

Un grupo de bacterias infecciosas que han recibido especial atención por su capacidad para evadir (o “escapar”) las terapias de uso común a través del desarrollo de la resistencia antimicrobiana es el conocido como grupo “ESKAPE”, el cual fue definido por primera vez en 2008, siendo las especies que lo componen *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* (Rice 2008).

Las cepas resistentes a antibióticos pertenecientes a bacterias del grupo ESKAPE se consideran patógenos nosocomiales importantes que causan morbilidad y mortalidad graves en todo el mundo. El grupo ESKAPE se ha convertido en un conjunto de organismos endémicos en muchas instituciones de salud en todo el mundo, y como resultado, se ha convertido en el principal foco de los esfuerzos internacionales de control de infecciones;

siendo colocado dentro de la lista de patógenos prioritarios de la OMS del 2024 (OMS 2024). La OMS clasificó los patógenos prioritarios bajo diversos criterios: Mortalidad, incidencia, carga sanitaria, tendencia a la resistencia, transmisibilidad, prevención, tratabilidad y posibilidad de nuevos tratamientos en un futuro cercano (Figura 3).



Figura 3. Patógenos bacterianos prioritarios de la OMS, 2024

La OMS clasificó a los géneros bacterianos en tres grupos de prioridad: grupo crítico (azul), grupo alto (morado) y grupo medio (celeste), respectivamente. Adaptado de (OMS 2024)

2.2 Estrés ambiental y respuestas de adaptación bacteriana

2.2.1 Resistencia y tolerancia bacteriana

La capacidad de supervivencia intrahospitalaria bacteriana se ha asociado históricamente a su capacidad de resistir a la acción de los agentes antimicrobianos esto incluye tanto antibióticos como desinfectantes.

La habilidad de las bacterias de resistir o tolerar al ataque antimicrobiano depende directamente del mecanismo de acción del agente. Los antibióticos pueden ser tanto bacteriostáticos como bactericidas. Un antibiótico bacteriostático tiene la capacidad de detener el crecimiento de una población bacteriana; mientras que un antibiótico bactericida tiene la capacidad de matar a las bacterias al inducir un mal funcionamiento de un proceso biológico vital para su supervivencia (Kaldalu et al. 2020).

El mismo principio antimicrobiano se aplica con la desinfección. Los desinfectantes, también llamados biocidas contienen uno o más compuestos activos que les permite, dependiendo de este, inhibir el crecimiento o eliminar a los microorganismos presentes en una superficie, ya sea viva o inerte (Rozman et al. 2021).

Hablamos de resistencia antimicrobiana cuando una bacteria es capaz de resistir la inhibición del crecimiento debido a una modificación genética adquirida que permite la degradación o expulsión del antibiótico, o la modificación de la diana del antibiótico; mientras que la tolerancia bacteriana se refiere a la capacidad de una población bacteriana para reducir su susceptibilidad con respecto al tiempo (muerte más lenta), ya sea debido a la baja actividad diana o la baja absorción de fármacos, a menudo asociados con un crecimiento lento o un metabolismo reducido inducido por el estrés (Fisher et al. 2017a; Kaldalu et al. 2020).

La tolerancia bacteriana a su vez puede ser genotípica o fenotípica. La tolerancia fenotípica suele ser resultado de un estrés ambiental, que ocasiona un retraso o la ausencia de su crecimiento, surge de una variación fenotípica que permite la degradación o eliminación del antibiótico, o modificación del objetivo (Fisher et al. 2017a; Kaldalu et al. 2020).

En estos estados se ha podido observar que las bacterias exhiben una alta heterogeneidad tanto fenotípica como genotípica, los niveles de resistencia y tolerancia a los antibióticos suelen variar entre células individuales o subpoblaciones y las de la población en general, las cuales suelen deberse en gran medida a la tasa de crecimiento bacteriano (Gollan et al. 2019; Kaldalu et al. 2020) (Figura 4).

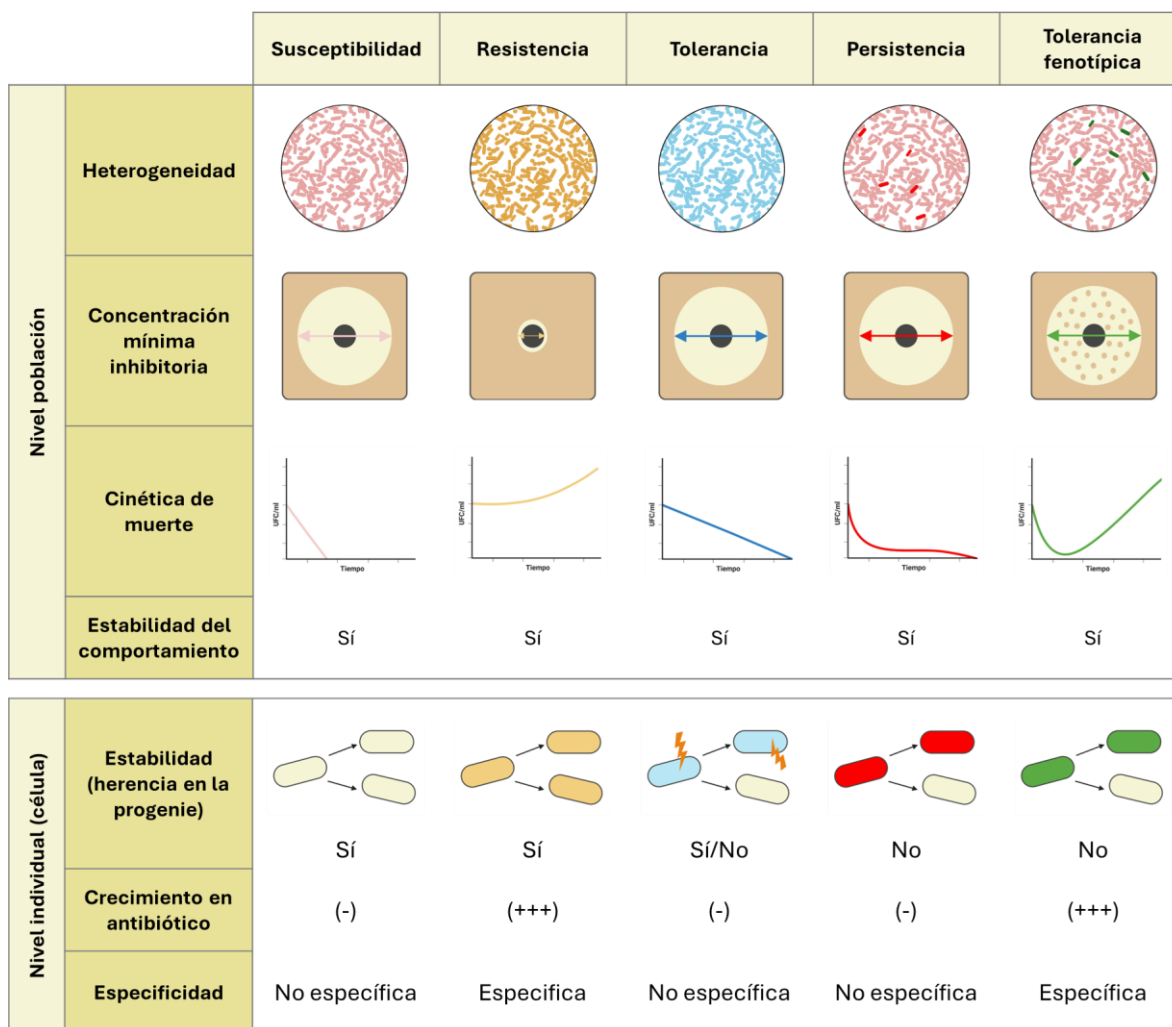


Figura 4. *Diferentes susceptibilidades bacterianas a los antibióticos*

Diagrama representativo de las características esenciales de una población bacteriana o célula para distinguir su susceptibilidad teórica a un antibiótico. Los rayos amarillos representan estrés. Adaptado de (Gollan et al. 2019). Elaborado en: Biorender.com

2.2.2 Persistencia bacteriana

La persistencia es un fenómeno dentro de los estados de tolerancia, en el cual existe una subpoblación de células bacterianas viables (membrana íntegra, metabolismo activo) de crecimiento lento o detenido, las cuales tienen una susceptibilidad reducida a la muerte por antibióticos bactericidas dentro de una población clonal susceptible, inducida por estrés ambiental (Fisher et al. 2017a; Niu et al. 2024).

Las bacterias persistentes (o *persisters*) son una subpoblación de células extremadamente tolerante a los antibióticos, quienes están en un estado transitorio de no crecimiento, lo cual distingue a este estado de la resistencia bacteriana. La persistencia no es heredable, los *persisters* son genéticamente idénticos a las bacterias sensibles, por lo que, al reanudar su crecimiento, las células hijas constarán de una mezcla de células sensibles con una pequeña fracción de persistentes. (Gollan et al. 2019; Kaldalu et al. 2020).

Estas células presentan una heterogeneidad fenotípica, lo cual ha dificultado su estudio, donde destacan 3 cualidades principales (Ayrapetyan, Williams, Baxter, et al. 2015; Balaban et al. 2004; Fisher et al. 2017a; Niu et al. 2024):

- 1) Diversidad metabólica, existen dos tipos de persistentes, bacterias metabólicamente estancadas en la fase estacionaria (tipo I) y bacterias de lento crecimiento (tipo II)
- 2) La variabilidad de la persistencia, hay bacterias cuyo nivel de persistencia es débil o superficial, mientras que otras presentan un nivel más fuerte o profundo, como aquellas bacterias capaces de ser inducidas al estado viable pero no cultivable (VBNC), un estado que se ha observado coexiste al mismo tiempo que las persistentes
- 3) El tamaño de las colonias, puede reflejarse en la aparición de variantes de colonias pequeñas (SCV), colonias aproximadamente 5 o 10 veces menor que el tipo de colonia más común, y una tasa de crecimiento más lenta en comparación con la cepa madre.

2.2.3 Estrés como inductor de persistencia bacteriana

La generación de bacterias persistentes es relativa y depende de diversos factores, entre ellos el tipo de cepa, la fase de crecimiento (la mayor cantidad de células persistentes se alcanza al llegar a la fase estacionaria), el antimicrobiano utilizado (que reducen la actividad metabólica bacteriana e interfieren con el crecimiento bacteriano y la replicación, tales como quinolones y macrólidos, conducirá a más bacterias entrar en un estado persistente para resistir el efecto), así como el nivel de estrés ambiental presente (Kaldalu et al. 2020; Niu et al. 2024).

En los últimos años se ha demostrado que diversas vías sugeridas para la formación de células persistentes implicaban el uso del estrés oxidativo como desencadenante. Este rol central del estrés oxidativo se ha podido estudiar en diversos modelos de estudio, esto incluye bacterias

intracelulares, en variantes de células pequeñas, así como la inducción de formación de biopelículas (Grant and Hung 2013; Vega et al. 2012) (Figura 5).

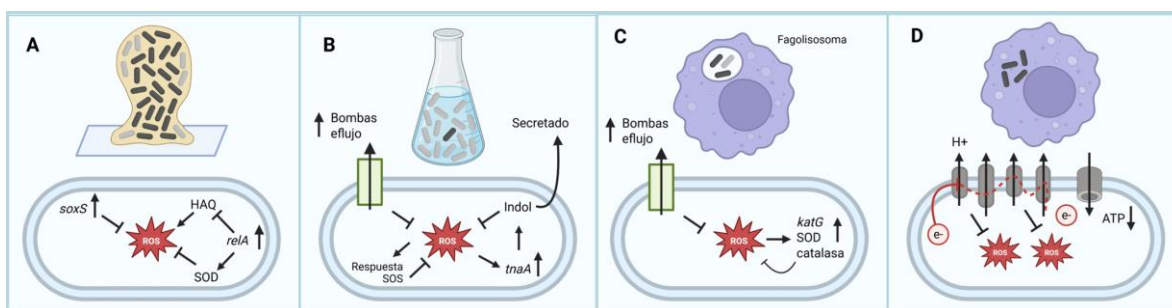


Figura 5. El papel del estrés oxidativo en diferentes modelos de persistencia bacteriana

El estrés oxidativo induce la regulación de enzimas antioxidantes, bombas de eflujo y disminuye la de compuestos prooxidantes. Se muestran los mecanismos moleculares específicos asociados a a) biopelículas, b) células persistentes c) bacterias intracelulares en fagocitos y d) variantes de colonia pequeña. Las células tolerantes se representan con óvalos negros y las sensibles con óvalos blancos. Adaptado de (Grant and Hung 2013)

2.3 Interacción entre bacterias persistentes y la respuesta inmune innata

Existen pocos estudios referentes a la interacción existente entre bacterias persistentes y las células de la respuesta inmune. En algunos patógenos intracelulares pertenecientes a las micobacterias se ha observado especies capaces de no solo evitar la maduración del fagocitos, sino sobrevivir al estallido respiratorio en macrófagos activados por IFN- γ , como lo son *Mycobacterium tuberculosis* y *M. marinum*, las cuales muestran tolerancia a los antibióticos, dependiente de la expresión de las bombas de eflujo necesarias para su crecimiento intracelular (Grant and Hung 2013).

En una investigación realizada por Hastings y colaboradores (2023) evaluaron la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* persistentes para evadir la respuesta innata del huésped, encontraron que las células persistentes resisten la muerte mediada por complemento, al evitar la unión con C5b; además, observaron que estas células son absorbidas por los macrófagos en menor tasa que su contraparte vegetativa regular, mientras que las células que si son interiorizadas provocan la polarización inicial al fenotipo M2 (Figura 6).

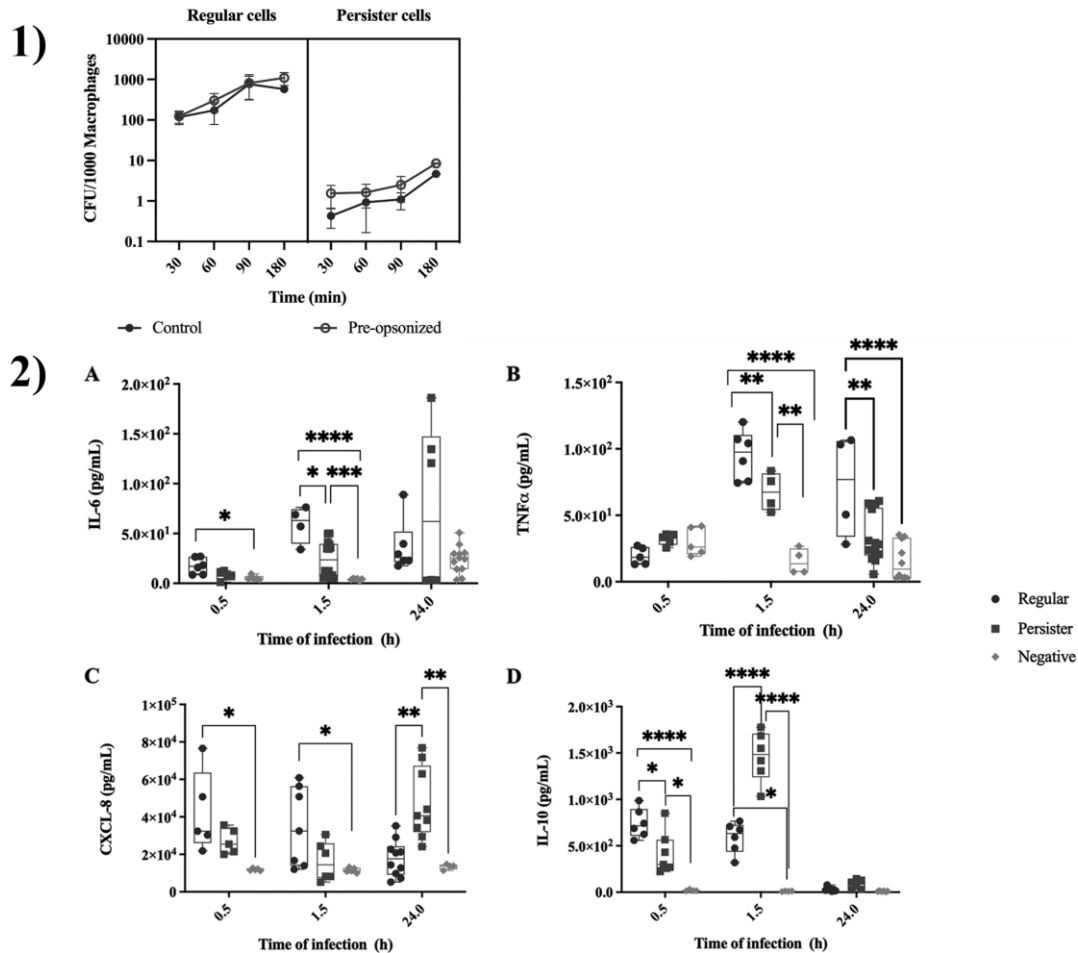


Figura 6. Persistencia bacteriana y respuesta inmune innata

1). Las células persistentes de *P. aeruginosa* fueron absorbidas significativamente menos ($P < 0,001$) por los macrófagos THP-1 en comparación con las células vegetativas regulares. 2) Se comparó la concentración de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (IL-10) entre macrófagos infectados por células persistentes y células vegetativas. Adaptado de Hastings et al. (2023).

Además de la capacidad de modular la respuesta inmune, se ha reportado un aumento en la citotoxicidad de las bacterias persistentes. Demostraron que el sistema toxina-antitoxina HigB-HigA de *Pseudomonas aeruginosa* es requerido para inducir persistencia mediada por la exposición a ciprofloxacina; mientras que, a su vez, la sobreexpresión de HigB aumenta la expresión de los genes asociados al sistema de secreción bacteriana tipo 3 (T3SS), así como

la citotoxicidad bacteriana hacia macrófagos, comparada con las células vegetales (Li et al. 2016).

Un efecto similar está reportado para *Salmonella*, Stapels et al. (2018) observaron que la *Salmonella* persistente reprograma macrófagos a un perfil antiinflamatorio mediante efectores secretados por el sistema de secreción del tipo 3 (TSS3) codificado por la isla de patogenicidad 2 de *Salmonella* (SPI-2). En su modelo de manipulación de macrófagos por *Salmonella* persistentes, los autores proponen tres diferentes situaciones que pueden ocurrir durante la interacción entre la bacteria y el hospedero:

- Susceptible a la muerte por antibiótico: Las bacterias en crecimiento translocan efectores SPI-2 que manipulan la polarización M2 y crean un entorno menos hostil. La proliferación hace que las bacterias sean susceptibles al tratamiento.
- Susceptible a la muerte inmunológica: La *Salmonella* no creciente inactiva no puede translocar los efectores del SPI-2 y se muere en el entorno fuertemente antimicrobiano.
- Persistente a ambos efectos: Los persistentes activos manipulan la polarización de las células del huésped a través de la translocación de los efectores SPI-2, y a su vez retienen su actividad y mantienen la capacidad de sobrevivir en el huésped mientras son tolerantes a los antibióticos.

Si bien la mayoría de la investigación referente a la persistencia bacteriana se ha llevado a cabo en bacterias Gram negativas, existen estudios donde se ha demostrado efectos similares en la respuesta inmune generada por bacterias Gram positivas persistentes.

Los macrófagos representan un nicho importante durante la bacteremia causado por *Staphylococcus aureus* y un trabajo reciente demostró que el peroxinitrito, producto de la reacción entre el superóxido y el óxido nítrico del estallido respiratorio del macrófago, es el principal mediador de la tolerancia en aislados clínicos de *S. aureus* (Beam et al. 2021).

Existen estudios que demuestran que la persistencia bacteriana en *Staphylococcus aureus* disminuye la patogenicidad y virulencia de la bacteria en comparación a su contraparte activa. (Mina and Marques 2016) observaron que la bacteria no es capaz de iniciar infecciones en *Arabidopsis thaliana* y presentan una virulencia significativamente reducida hacia *C. elegans*.

en comparación con las poblaciones totales. Por el contrario, las células persistentes de *S. aureus* reactivadas son capaces de iniciar infecciones en *A. thaliana* y en *Caenorhabditis elegans* aunque con menor mortalidad.

Este efecto es similar a lo observado en células viables pero no cultivables, estado que coexiste con la persistencia (Ayrapetyan et al. 2015). Liao et al. (2021) infectaron células HeLa con *Staphylococcus aureus* cultivables y no cultivables, demostraron que las células VBNC se interiorizan en menor manera que las células cultivables, provocando una menor deformación de la célula; asimismo, la expresión de genes asociados al sensor inmunitario de la célula (TLR2, NOD1) se disminuyó significativamente al interactuar con las células VBNC con respecto a las cultivables (Figura 7)

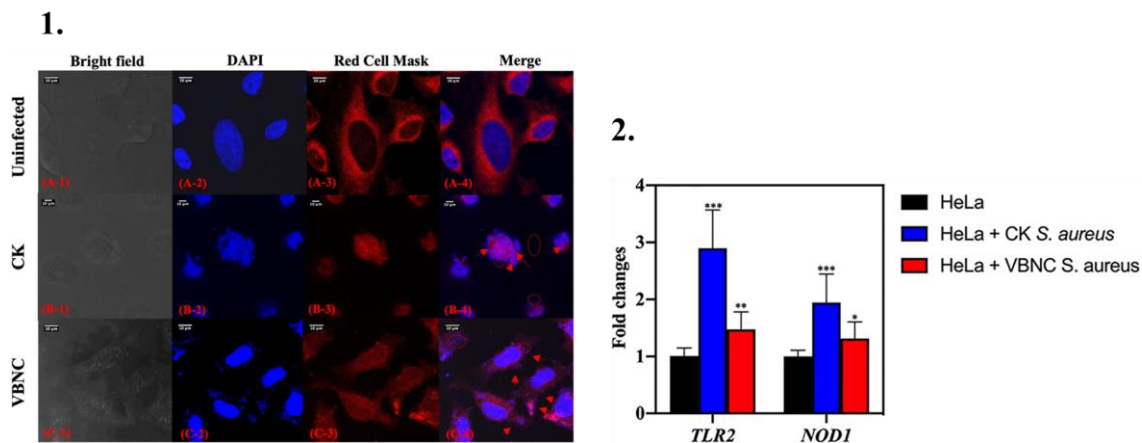


Figura 7. Patogenicidad de *Staphylococcus aureus* VBNC

1) Imágenes de microscopia confocal de barrido láser (CLSM) de células HeLa no infectadas o células HeLa infectadas con *S. aureus* cultivable (CK) o viable pero no cultivable (VBNC). Los círculos rojos indican *S. aureus* dentro de las células HeLa, y las flechas rojas apuntan a *S. aureus* unido a la superficie celular HeLa. 2) Niveles de expresión de genes inmunes (codificando TLR2 y NOD1) en células HeLa.

Esta diversidad de resultados demuestra la existencia de vacíos importantes en el conocimiento sobre el efecto de la persistencia bacteriana sobre la patogenia y virulencia bacteriana, así como su interacción con las células de la respuesta inmune, así como la adecuación de nuevas metodologías para su inducción *in vitro* para su estudio.

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias del grupo ESKAPE representan una de las principales amenazas para la salud pública debido a su alta resistencia a las terapias antimicrobianas, así como a su capacidad de sobrevivir en ambientes hospitalarios. En los últimos años, se ha reconocido que, además de la resistencia genética, estos patógenos poseen estrategias de persistencia fenotípica, en las cuales las bacterias mantienen su viabilidad metabólica, pero disminuyen su capacidad replicativa, dificultando su detección y favoreciendo la subestimación de la carga bacteriana en entornos clínicos.

Es posible que la persistencia bacteriana en bacterias ESKAPE pueda contribuir a la cronicidad de las infecciones, así como a la evasión de la respuesta inmune y la reaparición de brotes tras periodos de aparente eliminación, además de incrementar la tolerancia frente a los tratamientos, lo cual representa un desafío para los programas de control y vigilancia microbiológica; por lo que comprender el papel de los fenotipos persistentes en la evasión inmunológica aportará información clave para el diseño de nuevas estrategias de diagnóstico y control microbiológico.

4. HIPÓTESIS

El estado persistente de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, inducido por estrés oxidativo, favorece la evasión del reconocimiento por células de la inmunidad innata *in vitro*, así como su supervivencia bacteriana.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el impacto del estado persistente en la respuesta inmune innata desencadenada por *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la capacidad del hipoclorito de sodio para inducir persistencia bacteriana en aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* bajo diferentes concentraciones y tiempos de exposición.
- Comparar la susceptibilidad al sistema de complemento humano de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, persistentes y en estado basal
- Evaluar la activación de vías oxidativas y la supervivencia intracelular de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en estado persistente y basal durante la interacción con macrófagos RAW 264.7.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Aislamiento e identificación

6.1.1 Resiembra de las cepas clínicas

Para evaluar las diferencias entre la capacidad de inducir persistencia bacteriana en bacterias Gram positivas y negativas, se utilizaron cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, multidrogorresistentes (MDR), las cuales se compararon con dos cepas de referencia, sensibles a los antibióticos: *S. aureus* ATCC 29213 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 (n=4).

Partiendo de un cultivo primario de cada cepa se realizó una resiembra en 4 cuadrantes para cada bacteria. Para realizar las resiembras se utilizaron agares selectivos para los requerimientos de cada bacteria, siendo en el caso de las bacterias Gram positivas agar sangre azida; mientras que para Gram negativos usaremos agar MacConkey. En ambos casos las condiciones de incubación fueron de 37°C durante 24 horas. Pasado este tiempo se revisó la pureza de los cultivos y se repitió el proceso en caso de ser necesario hasta obtener cultivos puros.

Para cada bacteria se llevó a cabo una comparativa de las características fenotípicas de las colonias obtenidas (p. ej. mucosidad, hemólisis del agar sangre, producción de pigmentos) y comparamos con lo reportado en la literatura para cada especie.

6.1.2 Tinciones y pruebas bioquímicas

Para llevar a cabo la reidentificación de las cepas obtenidas, se llevó a cabo la identificación bacteriana a través de métodos microbiológicos convencionales. En primer lugar, se realizó la tinción Gram para las bacterias analizadas, las cuales se fijaron en un portaobjetos limpio con una gota de agua, y una vez fijado se procedió a colorear conforme al siguiente orden y tiempos: cristal violeta por 1 minuto, yodo lugol por 1 minuto, alcohol acetona por 10 segundos, y finalmente safranina por 1 minuto. Una vez teñida cada muestra se observó a 40X y 100X en un microscopio óptico.

Para las pruebas bioquímicas se realizaron las pruebas de catalasa y coagulasa, para la identificación de *Staphylococcus aureus*, así como la prueba de oxidasa y un sistema bioquímico de identificación para *Pseudomonas aeruginosa*. Para la prueba de catalasa, se

añadieron una gota de peróxido de hidrógeno a un portaobjetos limpio, para después colocar una colonia de la bacteria y esperar a que hiciera reacción. Se considera una reacción positiva si hay aparición de burbujas y si no hay presencia de estas se considera un resultado negativo.

Para la prueba de coagulasa se colocó una gota de plasma en un portaobjetos seco y limpio, para posteriormente agregar una colonia presuntiva al plasma. Se considera que la bacteria es coagulasa positivo cuando es capaz de generar aglutinación en un periodo no mayor a 15 segundos.

Para la prueba de oxidasa se utilizó una ampollita del reactivo N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina dihidrocloruro, cuyo contenido se depositó en un papel filtro en el cual se colocó una colonia bacteriana. Se considera una reacción positiva si hay un cambio en el color del reactivo de amarillo a azul-violeta en menos de 30 segundos y si no hay cambios o hay un cambio después de este tiempo se considera un resultado negativo.

Finalmente, se prepararon juegos de sistemas bioquímicos para cada *Pseudomonas* obtenida, en este caso se usaron 6 pruebas para cada sistema, las cuales son: MIO (Motilidad-Indol-Ornitina), TSI (Triple azúcar hierro), LIA (Lisina-Hierro-Agar), SIM (Sulfuro-Indol-Movilidad), citrato y urea. Cada prueba se inoculó por tubo mediante las técnicas de punción y estría, punción simple u homogenización dependiendo de la prueba bioquímica y se dejaron incubar de 18 a 24 horas en condiciones de 37°C. Posterior a ese tiempo se interpretaron las pruebas bioquímicas.

6.2 Inducción de células persistentes en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

Para inducir la persistencia bacteriana se utilizó el hipoclorito de sodio (NaClO) como agente inductor de estrés oxidativo. El hipoclorito tiene la capacidad para generar especies reactivas de cloro que afectan múltiples blancos celulares, incluyendo proteínas, lípidos de membrana y ácidos nucleicos, sin dirigirse a un único mecanismo de acción. A concentraciones subletales, el hipoclorito no provoca una muerte bacteriana inmediata, sino que puede inducir una supresión transitoria de la actividad metabólica, favoreciendo la entrada de las bacterias en estados fisiológicos tolerantes al estrés (Chen et al. 2018; Ye et al. 2020).

6.2.1 Cloración

Se prepararon diluciones de hipoclorito utilizando como base hipoclorito de sodio comercial (a concentración inicial de 6% v/v). A partir de una solución madre de 30 ppm de cloro libre se prepararon las concentraciones a utilizar, las cuales fueron: 12 y 20 ppm de cloro libre.

Para estandarizar el inóculo inicial, se realizó un cultivo puro de cada bacteria en medio BHI (infusión cerebro corazón) a 37° C por 18 horas (fase estacionaria). Después de este tiempo las bacterias fueron sedimentadas mediante centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, las células se resuspendieron en solución salina de NaCl (0.9%) hasta alcanzar una concentración aproximada de 10^6 UFC/mL.

En un tubo Falcon se agregaron en partes iguales 10 mL de la suspensión bacteriana junto a 10 mL de la solución acuosa de NaClO, a fin de conseguir la concentración final de estudio (6 y 10 ppm, respectivamente).

6.2.2 Ensayos de viabilidad bacteriana

A determinados tiempos de contacto de 30, 60, 90 y 120 minutos, las muestras se neutralizaron con tiosulfato de sodio pentahidratado ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) al 0.12% en relación 1:100. Usando 1 mL de la muestra neutralizada se realizó la cuenta en placa para determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL), las placas se incubaron a 37° C por 24 a 48 horas, dependiendo de la tasa de crecimiento. Con el crecimiento obtenido analizamos las características fenotípicas de las colonias y reidentificamos la bacteria.

Utilizando otro mililitro se determinó la reducción de la resazurina (azul alamar) como indicador de viabilidad celular y actividad metabólica (Rampersad 2012). Para esto, se añadió resazurina (0,015 %) a una placa de 96 pocillos (30 μL por cada 200 μL de muestra neutralizada por pocillo); posteriormente, la placa se incubó a 37° C de 2 a 4 horas en oscuridad y, finalmente, se medirá la absorbancia con una longitud de onda 570 nm y 600 nm. El porcentaje de viabilidad de la población se determinó mediante la siguiente ecuación (Ecuación 1):

Ecuación 1. *Porcentaje de reducción de resazurina*

$$\% \text{ reducción} = \frac{(\varepsilon_{\text{oxi600}} \times A_{570}) - (\varepsilon_{\text{oxi570}} \times A_{600})}{(\varepsilon_{\text{red570}} \times C_{600}) - (\varepsilon_{\text{red600}} \times C_{570})} \times 100, \text{ donde:}$$

- A570 = Absorbancia del tratamiento a 570 nm
- A600 = Absorbancia del tratamiento a 600 nm
- C570 = Absorbancia del control negativo a 570 nm
- C600 = Absorbancia del control negativo a 600 nm
- ε = Coeficientes de extinción molar, la intensidad con que la resazurina absorbe luz a una longitud de onda. La tabla 2 muestra los valores para las formas oxidada y reducida.

Tabla 2. *Coeficientes de extinción molar de la resazurina.*

Longitud	ε red	ε oxi
570 nm	155677	80586
600 nm	14652	117216

Una vez obtenido los porcentajes de viabilidad relativa, estos se analizaron mediante un ANOVA de dos vías para evaluar el efecto de la concentración de cloro, el tiempo de contacto y su interacción. Cuando se detectaron diferencias significativas, se realizaron comparaciones múltiples mediante la prueba de Tukey. Los datos corresponden a cinco réplicas biológicas independientes. Se consideró significancia estadística $p < 0.05$.

Para considerar que nuestros ensayos lograron obtener células persistentes, además de obtener células sobrevivientes a la cloración, nuestras curvas de cuenta en placa y actividad metabólica debieron mostrar la curva bifásica de muerte, es decir, mostrar una reducción dependiente del tiempo donde muestre caída rápida de UFC (bacterias sensibles) y después una meseta o pendiente mucho menor (subpoblación persistente) (Figura 8).

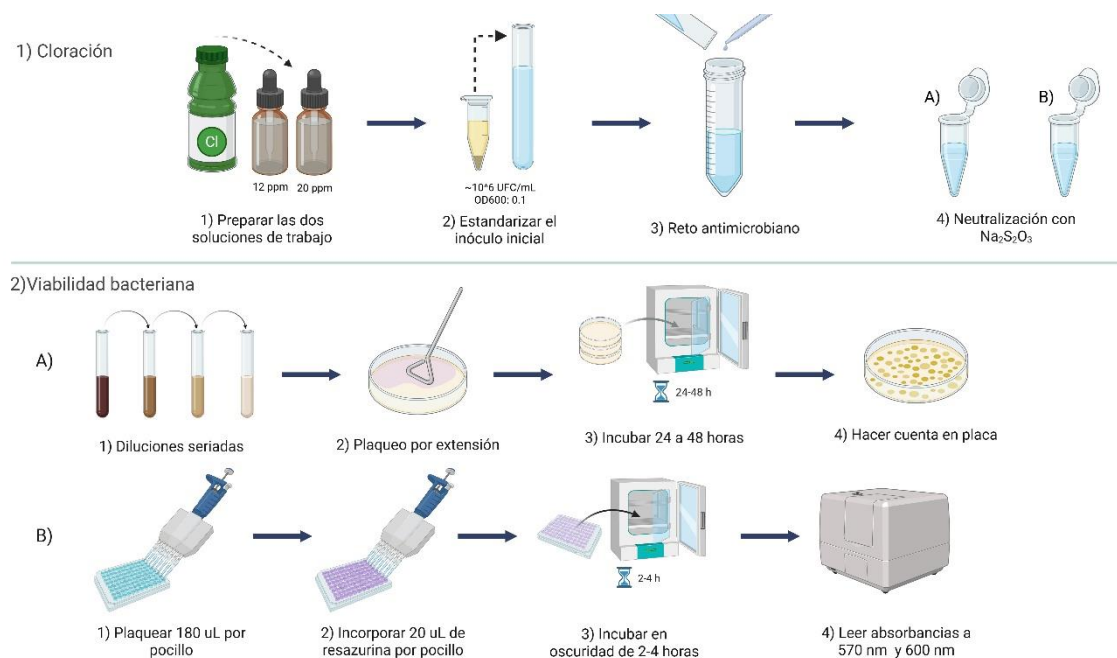


Figura 8. *Ensayo de cloración y viabilidad bacteriana*

Para inducir el estrés oxidativo en las bacterias modelo, se realizó un ensayo de inactivación por cloro (1), una vez concluido el tiempo de contacto se neutralizó el cloro y se determinó la viabilidad bacteriana (2), tanto en crecimiento en placa (2a) como su metabolismo (2b).

6.3 Efecto del suero humano en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* persistentes

El siguiente protocolo se basa en el experimento de (Hastings et al. 2023a). Para este protocolo se recolectó sangre completa de pacientes sanos para extraer suero humano completo (Anexo 1). Las células regulares y persistentes de *P. aeruginosa*, *S. aureus* se estandarizaron a una concentración final de 10^7 UFC/mL. Posteriormente, las diluciones de bacterias se resuspendieron en suero humano completo, PBS o suero inactivado por calor, en relación 1:1.

Las células se incubaron a 37 °C, y se determinó la viabilidad bacteriana mediante la técnica de resazurina, para esto se adicionaron 10 µL de EDTA 10 mM para detener la reacción a los 30 y 60 minutos de incubación, seguida 30 µL de resazurina. Las placas de 96 pocillos se incubaron durante 4 h a 37 °C y posteriormente en un lector de placas se midió la absorbancia

con una longitud de onda 570 nm y 600 nm y se obtuvieron porcentajes de viabilidad tal como se describió anteriormente. (Figura 8)

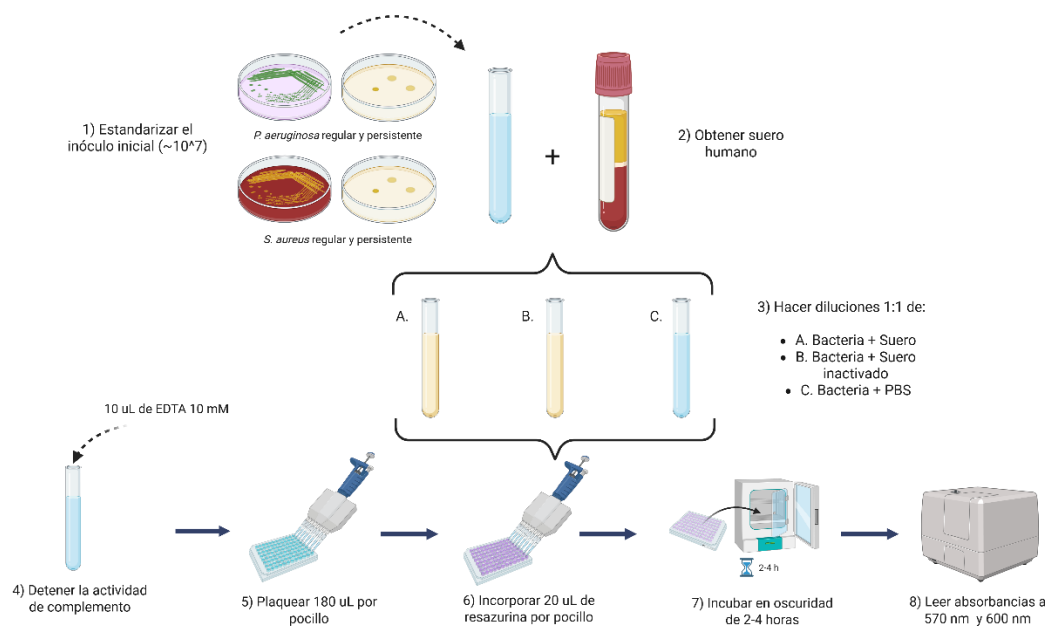


Figura 9. *Ensayo de actividad de complemento*

Los inóculos bacterianos persistentes y regulares fueron expuestos a suero humano activo, suero inactivado o PBS, seguido de la inhibición de la actividad de complemento con EDTA. La viabilidad bacteriana se determinó mediante la reducción de resazurina.

6.4 Interacción entre macrófagos y *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* persistentes

6.4.1 Mantenimiento de macrófagos RAW 264.7

La línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino, a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO₂, con cambios de medio cada 2 a 3 días. Los cultivos se dividieron una vez que alcanzaron un 70 a 80% de confluencia. Para los ensayos, las células se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad aproximada de 5×10^5 células por pocillo y se dejaron adherir durante 24 h antes de la infección.

6.4.2 Infección con *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* persistentes

Previo a la infección, se resuspendieron las células de *P. aeruginosa* y *S. aureus* persistentes y regulares hasta alcanzar una concentración estándar de 5×10^6 UFC/mL. A un grupo se le adicionaron suero activo por 1 hora para evaluar diferencias en la interiorización de acuerdo con la opsonización de las bacterias. Se iniciaron las infecciones con una MOI de 5 y se incubaron durante 120 minutos. Posterior al período de infección, se retiró el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS para después lisarlos con 10% de Triton X-100 durante 45 min. La viabilidad de las bacterias intracelulares se determinó mediante la técnica de *drop plate*, sembrando alícuotas sobre agar y cuantificando el porcentaje el área de crecimiento ocupada por las colonias bacterianas mediante el programa Fiji/ImageJ (Figura 9).

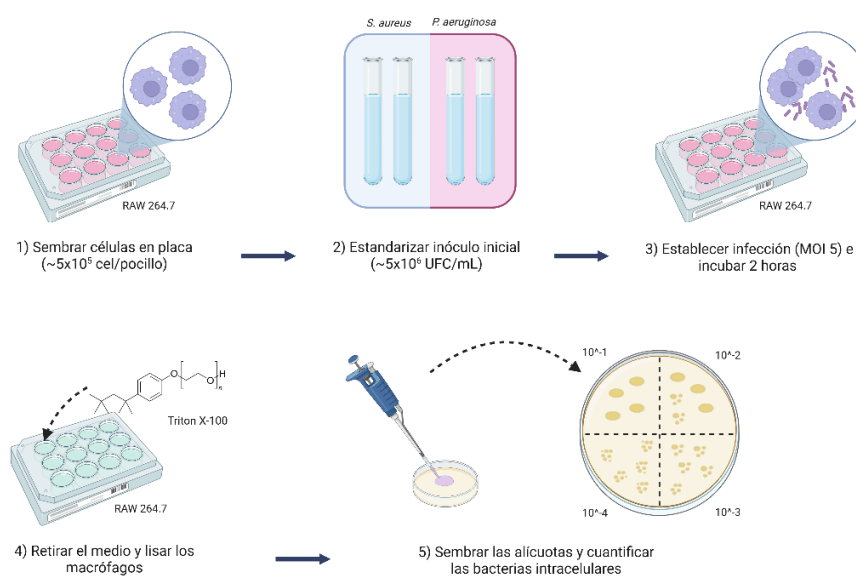


Figura 10. Ensayo de infección de macrófagos

Para determinar la supervivencia intracelular bacteriana, las células RAW 264.7 fueron infectadas con *S. aureus* y *P. aeruginosa* (MOI 5), posterior a las 2 horas de infección fueron lisadas y procesadas por diluciones y conteo de crecimiento.

6.4.3 Cambios morfológicos y producción de óxido nítrico

La activación de vías oxidativas en macrófagos RAW 264.7 fue evaluada mediante un ensayo de reducción de Nitro Blue Tetrazolium (NBT), adaptando el protocolo establecido por Sim Choi et al. (2006). Los macrófagos se infectaron con células regulares y persistentes de *P. aeruginosa* y *S. aureus* tal como se describió anteriormente. Posterior al periodo de infección, las células fueron incubadas con una solución de NBT bajo condiciones controladas de temperatura y tiempo. En algunos grupos experimentales se utilizó forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) como estimulador de la activación oxidativa celular.

La reducción intracelular del NBT por especies reactivas de oxígeno generadas durante el estallido respiratorio produjo la formación de cristales de formazán insoluble. Posteriormente, los cristales fueron solubilizados con una solución de KOH 2 M y DMSO, y la absorbancia fue determinada mediante espectrofotometría a 620 nm. Los resultados fueron expresados como valores de absorbancia, utilizándose como indicador indirecto de la activación oxidativa de los macrófagos. Como control se evaluó la reducción de NBT de macrófagos no infectados, con y sin PMA (Figura 11).

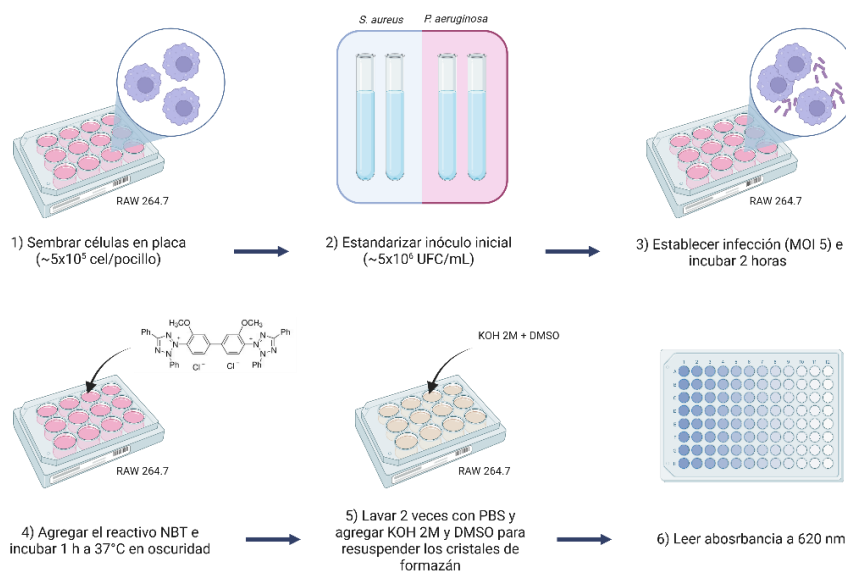


Figura 11. Ensayo de activación oxidativa NBT.

Las células RAW 264.7 infectadas con *S. aureus* o *P. aeruginosa* fueron incubadas con NBT para evaluar la producción de ROS mediante la reducción a formazán.

7. RESULTADOS

7.1 Efecto del estrés oxidativo en la inducción de persistencia bacteriana

Con el objetivo de evaluar el impacto del estrés oxidativo sobre la viabilidad bacteriana y la recuperación de subpoblaciones tolerantes persistentes, se analizaron cinéticas de reducción de resazurina en *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, sensibles y resistentes a antibióticos, expuestas a cloro a concentraciones de 6 y 10 ppm.

La exposición de *Staphylococcus aureus* a estrés oxidativo inducido por cloro produjo una disminución abrupta de la viabilidad durante los primeros 30 minutos de contacto, seguida de una fase estable caracterizada por una viabilidad residual baja, pero constante. Este comportamiento se observó tanto en la viabilidad metabólica como en el crecimiento de colonias, en ambas cepas, sensible y resistente, independientemente de la concentración de cloro utilizada.

Este patrón bifásico observado en las cinéticas de reducción de resazurina y en el crecimiento en placa coincide con la descripción propuesta en la literatura para la persistencia bacteriana, con una caída inicial drástica de la densidad bacteriana, seguida por la formación de una meseta poblacional (sin aumento ni disminución en la población), lo que sugiere la supervivencia de una subpoblación metabólicamente activa tras el estrés oxidativo; pero cuya capacidad replicativa se ve altamente disminuida (Figura 11).

Para descartar el efecto de la resistencia antimicrobiana sobre la supervivencia al estrés oxidativo, comparamos la viabilidad residual durante la fase de meseta de la cepa MDR de *S. aureus* con la cepa de referencia, ATCC. La cepa resistente presentó valores ligeramente mayores en comparación con la cepa ATCC, en ambas concentraciones de trabajo, tanto en términos metabólicos como en recuentos de UFC. Esta diferencia estadísticamente significativa sugiere una mayor tolerancia al estrés oxidativo en la cepa MDR con respecto a la cepa de referencia.

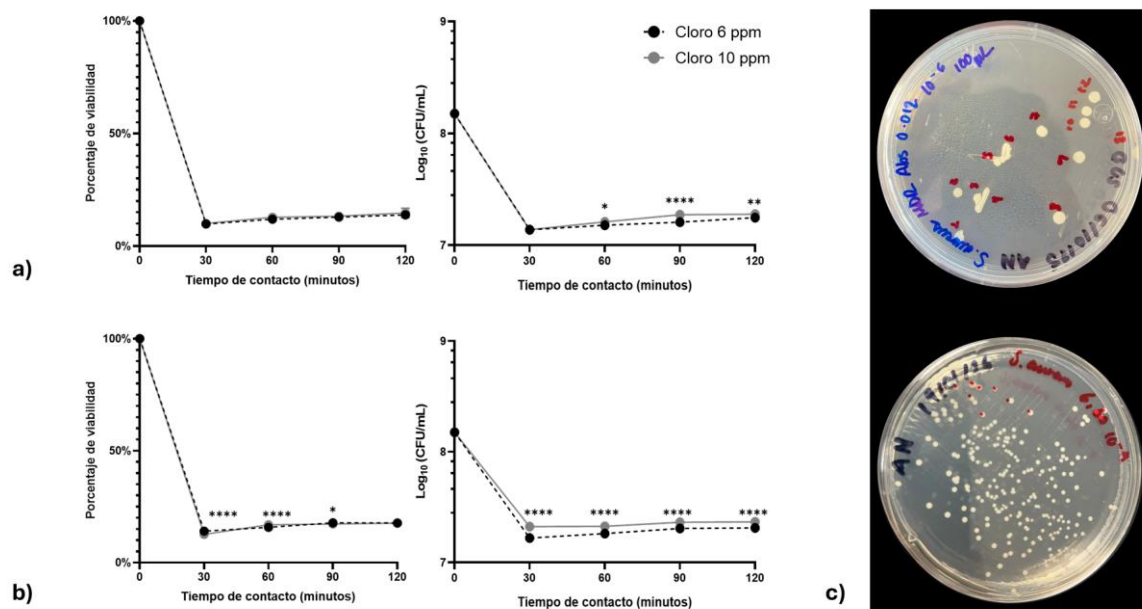


Figura 12. Efecto del estrés oxidativo sobre *Staphylococcus aureus*

Viabilidad metabólica (izq.) y cuenta en placa (der.) de las cepas ATCC 29213 (A) y MDR (B). (C) Colonias post-tratamiento de menor tamaño (abajo) respecto al control (arriba). Análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías. Los asteriscos indican diferencias significativas entre concentraciones (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Efecto similar se observó en las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*. La exposición al estrés oxidativo inducido por cloro produjo una disminución de la viabilidad metabólica durante los primeros 30 minutos de contacto, seguida de una fase de meseta que se mantuvo estable hasta los 120 minutos de evaluación, tal como ocurrió en *Staphylococcus aureus*. Este patrón bifásico fue consistente tanto en la cepa de referencia ATCC como en la cepa MDR, y no mostró variaciones significativas entre las concentraciones de 6 y 10 ppm de cloro (Figura 12).

No obstante, a diferencia de lo observado en *Staphylococcus aureus*, donde la cepa MDR mostró una mayor viabilidad residual con respecto a la cepa estándar, en *Pseudomonas aeruginosa* la cepa ATCC presentó una fracción sobreviviente ligeramente superior en comparación con la cepa MDR.

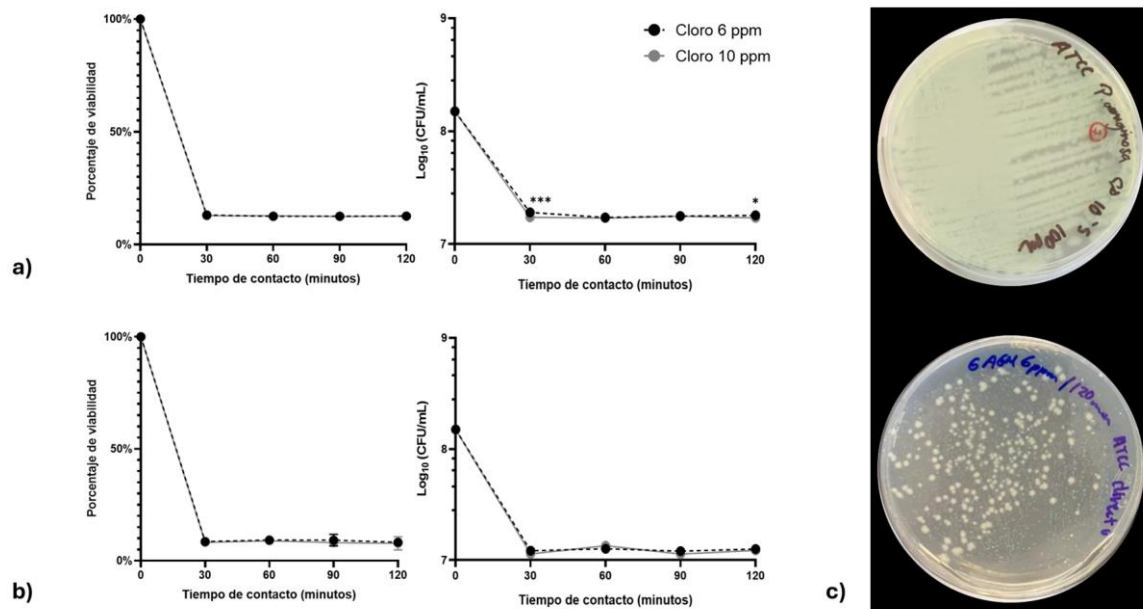


Figura 13. Efecto del estrés oxidativo sobre *Pseudomonas aeruginosa*

Viabilidad metabólica (izq.) y cuenta en placa (der.) de las cepas ATCC 27853 (A) y MDR (B). (C) Colonias post-tratamiento de menor tamaño (abajo) respecto al control (arriba). Análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías. Los asteriscos indican diferencias significativas entre concentraciones (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

Esta diferencia entre ambas bacterias parece indicar que la tolerancia al estrés oxidativo no se correlaciona necesariamente con el perfil de resistencia antimicrobiana; lo cual sugiere que las características fisiológicas asociados a la resistencia antimicrobiana son independientes a los mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo, así como dependientes de la especie bacteriana.

En general, la viabilidad residual de ambas bacterias no mostró una dependencia estadísticamente significativa a la concentración de cloro, lo que sugiere que la presencia de subpoblaciones tolerantes al estrés depende principalmente del tiempo de contacto con el agente oxidativo.

Adicionalmente, el análisis de comparaciones múltiples reveló que distintos grupos comparten niveles de viabilidad estadísticamente indistinguibles, tanto en metabolismo como

en formación de colonias, lo que indica que la respuesta al estrés no es homogénea, sino que refleja un continuo cambio de estados fisiológicos dentro de la población bacteriana (Figura 13).

En resumen, estos resultados concuerdan con la definición de persistencia bacteriana y validan el uso de este modelo para el estudio e inducción de subpoblaciones tolerantes al estrés oxidativo.

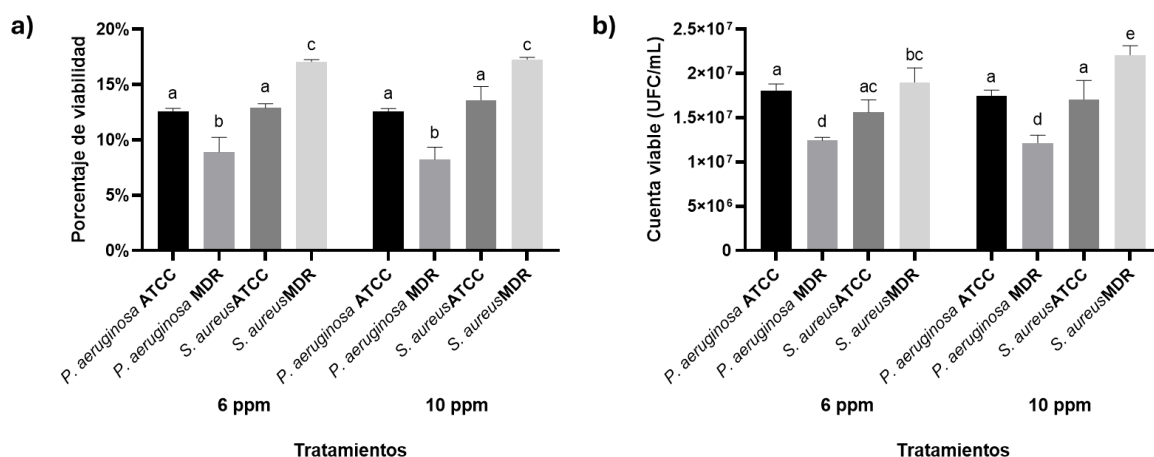


Figura 14. Viabilidad residual de las cepas tras el estrés oxidativo

Porcentaje de viabilidad metabólica (A) y crecimiento en placa (B) residuales tras los ensayos antimicrobianos en las cuatro cepas probadas. Letras distintas indican diferencias significativas entre cepas (Tukey, $p < 0.05$), mientras que letras compartidas indican ausencia de diferencias significativas.

7.2 La persistencia disminuye la susceptibilidad al sistema de complemento humano en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*

Posterior a la inducción de persistencia se evaluó la susceptibilidad al sistema de complemento de bacterias en estado basal como persistente, mediante la actividad metabólica (reducción de resazurina) en condiciones de suero activo, suero inactivado y solución salina.

En *Staphylococcus aureus*, se observó que, tal como se describe en la literatura, la exposición a suero activo no redujo de manera importante la actividad metabólica tanto en la población basal como en la persistente. En contraste, el tratamiento con suero inactivado mostró valores de actividad metabólica superiores al 100% respecto al control en ambas condiciones, siendo este efecto más evidente en la población persistente (Figura 14).

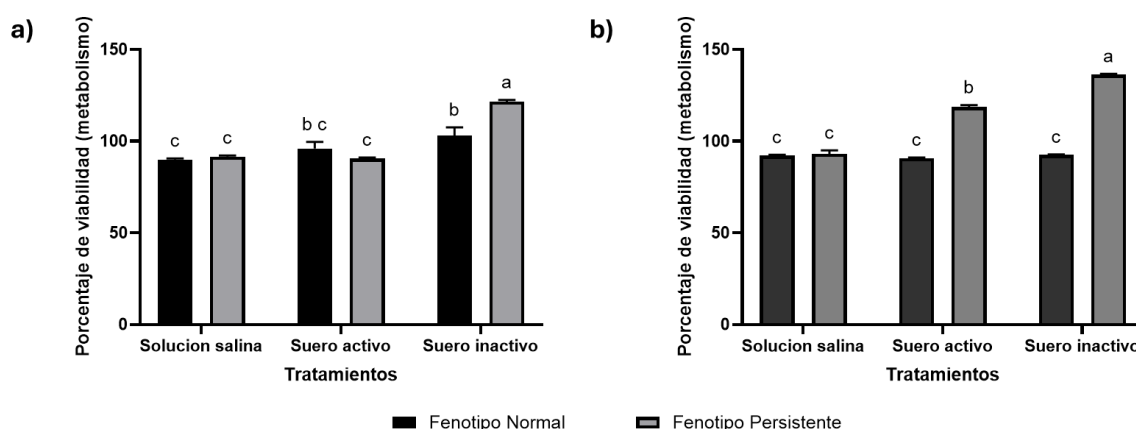


Figura 15. Efecto del suero humano en la viabilidad de *Staphylococcus aureus* persistente

La actividad metabólica fue evaluada mediante la reducción de resazurina y se expresa como porcentaje relativo respecto al control. Se compararon tres condiciones: solución salina, suero activo y suero inactivado (56 °C, 30 min). Los datos se presentan como media $\pm$ SD de 3 experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$), mientras que letras compartidas indican ausencia de diferencias significativas.

Por otro lado, en *Pseudomonas aeruginosa*, la exposición al suero humano activo resultó en una disminución marcada de la actividad metabólica en comparación con el control, lo que indica una mayor susceptibilidad al sistema de complemento. Este efecto se observó tanto en

bacterias en estado basal como en persistentes, aunque la reducción fue ligeramente menos pronunciada en estas últimas. En contraste, el suero inactivado no indujo una disminución de la actividad metabólica, e incluso, al igual que en *S. aureus*, se observó un incremento relativo en comparación con la solución salina (Figura 15).

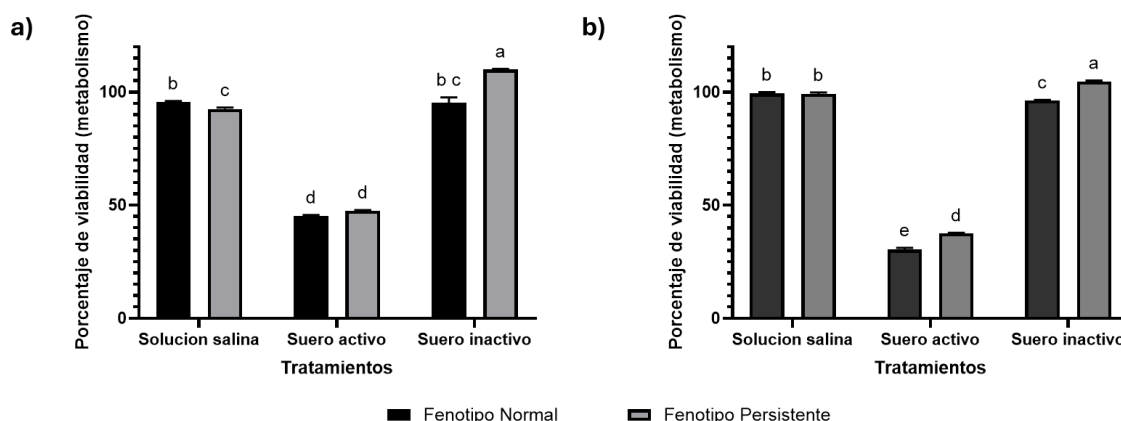


Figura 16. Efecto del suero humano en la viabilidad de *Pseudomonas aeruginosa* persistente

La actividad metabólica fue evaluada mediante la reducción de resazurina y se expresa como porcentaje relativo respecto al control. Se compararon tres condiciones: solución salina, suero activo y suero inactivado (56 °C, 30 min). Los datos se presentan como media $\pm$ SD de 3 experimentos independientes. Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$), mientras que letras compartidas indican ausencia de diferencias significativas.

De manera general, los resultados muestran un comportamiento diferencial entre especies: mientras que *Staphylococcus aureus* presentó una alta tolerancia al sistema de complemento, *Pseudomonas aeruginosa* fue significativamente susceptible. Asimismo, las poblaciones persistentes tendieron a mantener o incrementar su actividad metabólica en condiciones de suero inactivado, en comparación con sus contrapartes basales.

Es importante destacar que los valores superiores al 100% observados en suero inactivado probablemente reflejan un incremento en la actividad metabólica bacteriana inducido por componentes del suero, en contraste con la solución salina, la cual una condición metabólicamente limitada.

Estos resultados sugieren que los estados de tolerancia bacteriana pueden limitar el efecto del sistema de complemento sobre la actividad metabólica. Asimismo, es posible que, en ausencia de actividad del complemento, las bacterias aprovechen los componentes del suero para reactivar su metabolismo, evidenciando que la tolerancia bacteriana, en particular la persistencia, es un estado fisiológico dinámico capaz de responder a condiciones favorables y, por lo tanto, reversible.

7.3 El estado persistente favorece la supervivencia intracelular *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* en macrófagos murinos RAW 264.7

Con el objetivo de evaluar el efecto de la persistencia bacteriana sobre la capacidad de supervivencia intracelular, se comparó la recuperación bacteriana posterior a la infección de macrófagos RAW 264.7 de células normales y persistentes de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, tanto en condiciones opsonizadas como no opsonizadas.

Para determinar la recuperación bacteriana, analizamos de manera semicuantitativa el crecimiento obtenido en las placas de Petri mediante cuantificación del porcentaje de área ocupada por crecimiento utilizando el programa Fiji/ImageJ. Tras comparar el promedio de los porcentajes de nuestras 3 réplicas observamos diferencias entre ambos fenotipos bacterianos en ambas especies.

En condiciones sin opsonización, las bacterias persistentes de *S. aureus* mostraron una mayor recuperación intracelular en comparación con las bacterias normales de la misma especie. Las células persistentes presentaron un área de crecimiento de 6.78%, mientras que las bacterias normales mostraron únicamente 1.51% de área ocupada por crecimiento bacteriano. Estos resultados sugieren una mayor capacidad de supervivencia intracelular asociada al estado persistente en *S. aureus*.

Por otro lado, *P. aeruginosa* presentó porcentajes más elevados de recuperación intracelular tanto en bacterias normales como persistentes, en comparación con *S. aureus*. No obstante, a diferencia de lo observado en *S. aureus*, las diferencias entre ambos estados fisiológicos fueron mínimas, siendo que las bacterias normales mostraron un porcentaje de recuperación de 13.4%, mientras que las persistentes alcanzaron 14.62%.

Posteriormente, con el fin de evaluar el efecto de la opsonización sobre la interiorización de las bacterias persistentes, colocamos nuestros cultivos en contacto con suero activo por una hora. Tras este proceso y posterior infección, se observaron cambios en el patrón de recuperación intracelular.

En *S. aureus*, la recuperación de bacterias normales aumentó considerablemente respecto a las condiciones no opsonizadas, alcanzando 5.58%; mientras que las bacterias persistentes presentaron un valor ligeramente disminuido de 4.93%. Por su parte, *P. aeruginosa* mantuvo

niveles elevados de recuperación intracelular tras la opsonización, observándose 13.39% para bacterias normales y 10.90% para bacterias persistentes.

Estos datos en conjunto sugieren que las bacterias persistentes poseen una mayor capacidad de supervivencia al ambiente intracelular de los macrófagos, inclusive tras estar en contacto con suero activo. Además de esto, las diferencias observadas entre especies plantean estrategias distintas de interacción con la respuesta inmune innata, donde *S. aureus* persistente parece asociarse con una mayor tolerancia al entorno intracelular, mientras que *P. aeruginosa* presenta una elevada recuperación bacteriana independientemente del estado persistente (Figura 16 a y b).

Otro dato importante es que se observaron diferencias morfológicas asociadas tanto a la especie bacteriana como a las condiciones de opsonización tras la infección. En condiciones sin opsonización, las bacterias persistentes recuperadas tendieron a restablecer características morfológicas similares a las observadas en sus estados basales.

Particularmente, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, tanto las bacterias normales como las persistentes presentaron nuevamente producción visible de pigmentación compatible con pioverdina, además de una morfología colonial más extendida y difusa sobre el medio de cultivo. Estos hallazgos sugieren una recuperación parcial de la actividad metabólica bacteriana posterior a la interacción intracelular con los macrófagos.

En contraste, tras la opsonización se observó una modificación en la morfología de las bacterias recuperadas; tanto en *P. aeruginosa* como *S. aureus* las colonias fueron más compactas y con menor dispersión sobre el agar, así como la ausencia de pigmentación. Estas características fueron consistentes con las observadas previamente durante los ensayos iniciales de inducción de persistencia bacteriana.

En conclusión, estos hallazgos parecen indicar que la opsonización podría influir no solamente en la interacción fagocítica, sino también afectando características asociadas con el estado metabólico y la expresión fenotípica bacteriana (Figura 16 c).

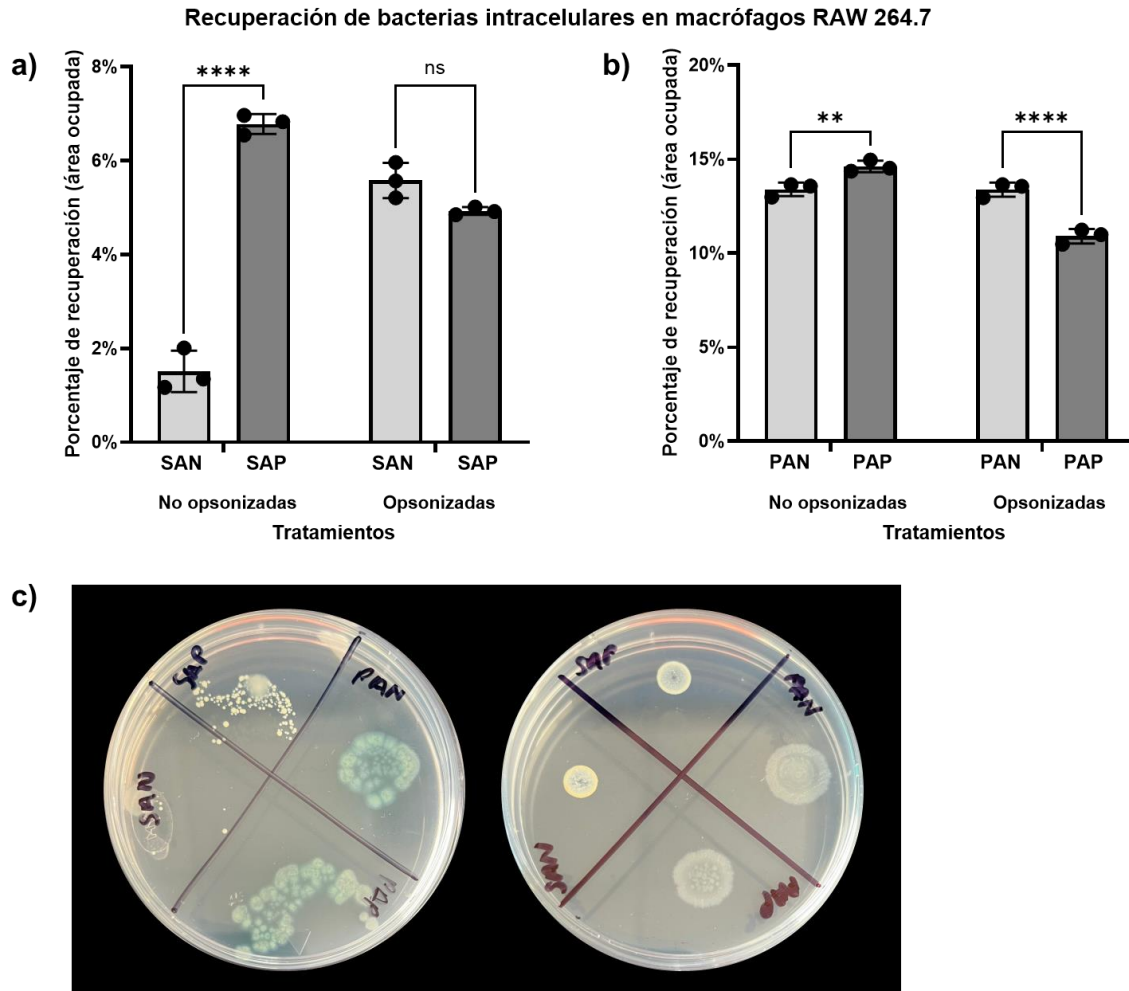


Figura 17. *Supervivencia intracelular de bacterias persistentes en macrófagos*

Se muestran los porcentajes de recuperación, expresados por área de crecimiento en placa, de *S. aureus* (a) y *P. aeruginosa* (b), en condiciones normales y de opsonización. Los datos se presentan como media $\pm$ SD de 3 experimentos independientes. Además, se muestran las morfologías obtenidas tras la recuperación intracelular (c), sin opsonizar (izq.) y tras opsonizar (der.). SAN: *S. aureus* normal, SAP: *S. aureus* persistente, PAN: *P. aeruginosa* normal, PAP: *P. aeruginosa* persistente.

Una vez evaluada de supervivencia intracelular, se decidió evaluar la activación de mecanismos oxidativos en macrófagos RAW 264.7 tras las infecciones con bacterias normales y persistentes, se determinó la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) como indicador indirecto de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Los macrófagos fueron infectados con células normales y persistentes de *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, en presencia o ausencia de PMA como control de activación de los macrófagos.

En el modelo de infección con *S. aureus*, los macrófagos infectados con bacterias persistentes mostraron un incremento significativo en la reducción de NBT en comparación con aquellos infectados con bacterias normales, tanto en ausencia como en presencia de PMA (Figura 17).

En condiciones sin PMA, las células infectadas con bacterias persistentes presentaron los valores más elevados de absorbancia, indicando una mayor activación de vías oxidativas. De manera similar, en presencia de PMA se mantuvo esta tendencia, observándose nuevamente una mayor reducción de NBT en el grupo persistente respecto al grupo normal y al control no infectado.

Sin embargo, en el modelo de infección de *P. aeruginosa* se observó un patrón distinto. En ausencia de PMA, los macrófagos infectados con bacterias persistentes mostraron un incremento significativo en la reducción de NBT respecto al control no infectado, aunque las diferencias frente a las bacterias normales fueron menos pronunciadas y presentaron mayor dispersión entre réplicas biológicas.

Asimismo, en presencia de PMA, las diferencias entre la reducción de NBT por parte de *P. aeruginosa* normales y persistentes tendieron a disminuir, observándose valores relativamente similares entre ambos grupos experimentales, siendo estos ligeramente superiores a los observados en los macrófagos control sin infección.

Estos resultados indican que las bacterias persistentes conservan la capacidad de inducir activación oxidativa en macrófagos, particularmente en el caso de *S. aureus*. Asimismo, los datos sugieren que la persistencia bacteriana no necesariamente se asocia con una disminución de la activación inmune innata, sino que podría coexistir con una respuesta oxidativa elevada por parte del hospedero.

Si bien la supervivencia al estrés oxidativo lo pudimos corroborar mediante la inducción de persistencia con hipoclorito de sodio, este fenómeno podría reflejar mecanismos de tolerancia al estrés oxidativo que permiten la supervivencia bacteriana aun en un entorno inmunológicamente activo como lo es dentro de los fagosomas de los macrófagos.

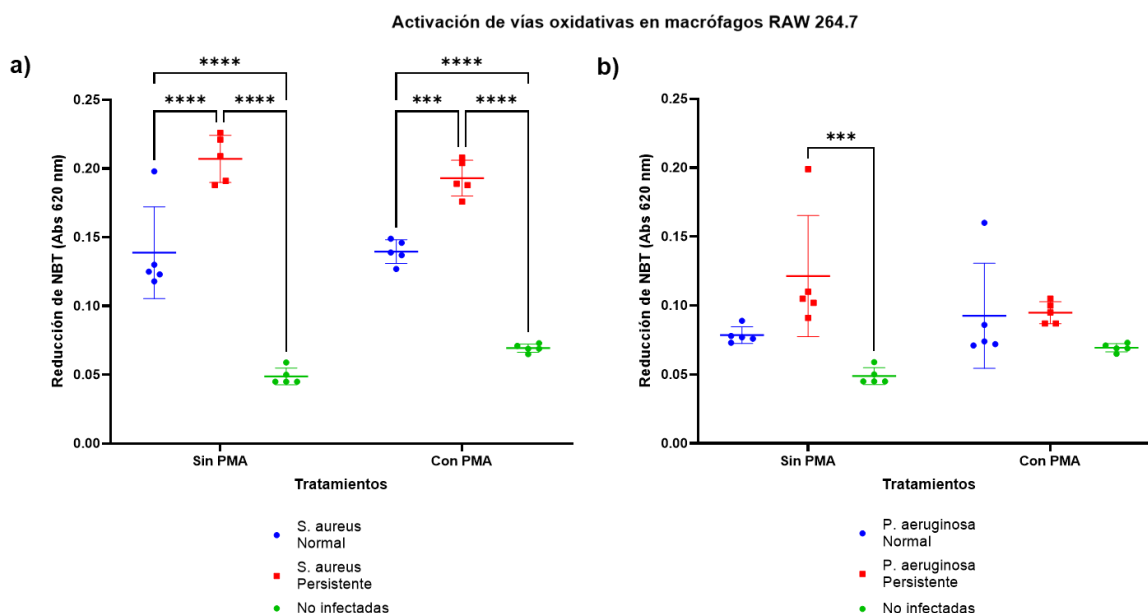


Figura 18. Efecto de la persistencia bacteriana sobre la activación de macrófagos RAW 264.7

Se muestran los valores de absorbancia obtenidos de la reducción de NBT por los macrófagos infectados por *S. aureus* (a) y *P. aeruginosa* (b). Los datos se presentan como media $\pm$ SD de 5 experimentos independientes. Análisis estadístico mediante ANOVA de dos vías. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

En conjunto, los resultados de la recuperación intracelular y la reducción del NBT sugieren que la activación oxidativa de los macrófagos no elimina completamente las bacterias persistentes. Este comportamiento sugiere que la persistencia permite a las bacterias resistir los mecanismos microbicidas activos sin evitar completamente el reconocimiento inmunológico. Dicho fenómeno podría estar relacionado con adaptaciones metabólicas

transitorias, mecanismos antioxidantes bacterianos y una disminución de la susceptibilidad a especies reactivas de oxígeno.

Por otro lado, a diferencia de *S. aureus*, *P. aeruginosa* presentó una elevada recuperación intracelular, pero con una respuesta oxidativa menos pronunciada, lo cual parece indicar un modelo diferente de persistencia, más inclinado a mecanismos de modulación inmune, más que únicamente con resistencia directa al estrés oxidativo.

8. DISCUSIÓN

Las infecciones crónicas representan un desafío terapéutico a nivel global. Hay cada vez más evidencia del papel que juegan las bacterias persistentes en la recaída y cronicidad de infecciones bacterianas. La caracterización de estas células persistentes es importante, no solo en lo que comprende a la dinámica poblacional, sino también con respecto al estudio de tolerancia a los antibióticos y la supervivencia ambiental en entornos hospitalarios; sin embargo, son pocos los estudios que analizan la formación de persistencia en aislados clínicos.

En nuestro trabajo, la cuantificación de las células persistentes de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* demostró que la exposición al estrés oxidativo inducido por hipoclorito no solo genera una reducción rápida de la viabilidad bacteriana, sino que favorece la presión selectiva de subpoblaciones tolerantes. Sin embargo, la discrepancia entre la viabilidad metabólica y en el crecimiento en placa de ambas bacterias indica que la respuesta al estrés oxidativo no es homogénea, sino que refleja la coexistencia de distintos estados fisiológicos dentro de la población bacteriana.

Tal como está descrito en la literatura, un patrón que ha sido ampliamente descrito como un sello distintivo de la persistencia bacteriana es una cinética de reducción bacteriana bifásica, con una reducción inicial abrupta de la viabilidad seguida de una fase de meseta (Fisher et al. 2017; Gollan et al. 2019). La exposición a concentraciones subinhibitorias del hipoclorito de sodio permitió observar este comportamiento bifásico característico en ambas bacterias.

No obstante, un hallazgo relevante en este estudio es la diferencia observada entre la viabilidad metabólica (resazurina) y el recuento en placa (UFC), especialmente en *Staphylococcus aureus*. Mientras que la actividad metabólica residual se mantiene en niveles relativamente mayores, la capacidad de formar colonias se encuentra significativamente reducida. Este fenómeno sugiere la presencia de subpoblaciones viables con actividad metabólica conservada, pero con una capacidad replicativa disminuida.

La idea de la coexistencia de subpoblaciones viables cultivables y no cultivables está parcialmente reportado en la literatura. El equipo de Ayrapetyan, Williams, y Oliver (2015), por mencionar un ejemplo, estableció el concepto de dormancia continua. En este modelo, las células pueden transitar entre estados fisiológicos con distintos niveles de actividad

metabólica y capacidad de crecimiento, dependiendo del grado de estrés ambiental. En particular, los autores concluyen que el total de células recuperadas tras el efecto de un estrés bactericida depende del equilibrio entre células persistentes y las células VBNC.

Bajo esta perspectiva, que la viabilidad reportada con base en la capacidad metabólica detectada por la reducción de resazurina fuera mayor en comparación con los valores de UFC podría explicarse por la presencia simultánea de células persistentes y VBNC, las cuales contribuyen a la actividad redox sin ser detectadas por métodos basados en culturabilidad.

Esto es consistente con lo reportado por otro estudio del grupo de trabajo de Ayrapetyan y colaboradores (2015), donde se demostró que la viabilidad medida por métodos independientes de cultivo puede exceder significativamente la fracción cultivable, evidenciando que los métodos tradicionales subestiman la supervivencia bacteriana, concluyendo que el mismo estrés ambiental genera estocásticamente una cantidad de células persistentes y en VBNC.

Otro hallazgo encontrado por este grupo de trabajo y que concuerda con lo observado en nuestro proyecto es la capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* persistente de modular la respuesta contra el complemento humano.

De manera interesante, Ayrapetyan et al. demostraron que el propio suero humano puede inducir la formación de persisters y células VBNC, apoyando la idea de que la presión inmunológica actúa como un estímulo ambiental capaz de favorecer estados de dormancia bacteriana. Esto podría explicar por qué durante infecciones crónicas ciertas subpoblaciones bacterianas sobreviven incluso en presencia de una respuesta inmune funcional.

Particularmente, en *P. aeruginosa* persistente se ha observado que estas células resisten la eliminación mediada por el complejo de ataque a membrana (MAC), aun cuando presentan opsonización por C3b, esto no relacionado a una falta en el reconocimiento inmunológico, sino debido principalmente a una menor deposición de C5b sobre la superficie bacteriana, limitando así la formación eficiente del MAC (Hastings et al., 2023).

Estos resultados parecen apuntar a que el estado persistente no permite la evasión inmunológica, sino que modula la respuesta asociada a su reconocimiento por parte de las células de la respuesta inmune. Para evaluar este efecto, se realizó los ensayos de infección

de macrófagos RAW 264.7, con el fin de determinar cuándo la célula era capaz de reconocer e interiorizar a la bacteria, dependiendo de su fenotipo.

Los resultados obtenidos durante los ensayos de infección de macrófagos sugieren que las bacterias persistentes presentan una interacción alterada con las células fagocíticas, poseyendo ventajas adicionales más allá de la tolerancia antimicrobiana, sino también con la supervivencia intracelular y la evasión de mecanismos efectores de la inmunidad innata.

Diversos estudios recientes han demostrado que *P. aeruginosa* es capaz de invadir células del hospedero y establecer nichos intracelulares que favorecen su persistencia a largo plazo. El ensayo de recuperación intracelular que realizamos complementa y fortalece esta interpretación.

Tanto en condiciones pre como post-opsonización se observó recuperación bacteriana intracelular de las poblaciones persistentes, lo que sugiere que la internalización por los macrófagos no necesariamente se traduce en eliminación bacteriana efectiva. La opsonización favoreció la recuperación intracelular, indicando probablemente un aumento en la fagocitosis mediada por receptores Fc y/o complemento. Sin embargo, las bacterias persistentes continuaron sobreviviendo tras la internalización.

Estudios recientes que describen a *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* como patógenos intracelulares no canónicos capaces de establecer nichos replicativos dentro de células del hospedero. En *P. aeruginosa* se ha documentado la formación de estructuras intracelulares tipo biopelícula, y desarrollo reversible de fenotipos persistir dentro de células infectadas (Kember et al. 2022).

Entre los principales mecanismos involucrados destacan los sistemas de secreción tipo III (T3SS) y tipo VI (T6SS), cuyos efectores alteran activamente la señalización celular y el citoesqueleto del hospedero. Particularmente, se ha estudiado la capacidad de la proteína efectora ExoS para inhibir la acidificación vacuolar y facilitar el escape desde fagosomas, permitiendo la supervivencia intracelular de *P. aeruginosa* dentro de macrófagos, así como la lisis de macrófagos infectados, favoreciendo tanto la evasión inmunológica como la diseminación bacteriana (Garai et al. 2019).

Por otra parte, *Staphylococcus aureus* posee múltiples mecanismos de persistencia intracelular, incluyendo alteración de la acidificación fagosomal, la manipulación de autofagia y retraso de vías de muerte celular del hospedero. Estos mecanismos podrían contribuir a explicar la supervivencia observada en la población persistente tras fagocitosis y opsonización (Kember et al. 2022).

Posteriormente, al evaluar la capacidad de activación de los macrófagos mediante el ensayo NBT, observamos que las poblaciones persistentes ocasionaron una mayor reducción del NBT, asociándose a una mayor actividad oxidativa; no obstante, aun con la estimulación con PMA, esta elevada actividad no se tradujo en una mayor actividad bactericida; por el contrario, las condiciones persistentes mostraron una respuesta atenuada al estímulo.

Este patrón sugiere que la persistencia bacteriana podría asociarse no a una ausencia de activación inmune, sino a una reprogramación funcional de la respuesta oxidativa del macrófago.

La aparente paradoja observada entre una mayor reducción basal de NBT y una menor respuesta inducida tras PMA podría interpretarse como evidencia de un estado oxidativo basal sostenido, pero funcionalmente no efectivo. En este sentido, las bacterias persistentes podrían inducir una activación crónica o subóptima del macrófago, suficiente para mantener señales redox detectables, pero insuficiente para desencadenar un estallido oxidativo plenamente eficiente.

Siguiendo esta lógica, existen reportes de que *Pseudomonas aeruginosa* puede modular el estallido oxidativo de células fagocíticas e interferir específicamente con vías activadas por PMA y proteína cinasa C (lo que normalmente promueve el ensamblaje de la NADPH oxidasa y la producción de especies reactivas de oxígeno), disminuyendo la capacidad de amplificación de la respuesta oxidativa inducida experimentalmente (Terada et al. 1999; Wu et al. 2016).

Bajo este contexto, es posible que las células persistentes de *P. aeruginosa* tengan capacidades inmunomoduladoras, que reduzcan la activación oxidativa inducida por PMA. Esto explicaría por qué, a pesar de la estimulación exógena, no se observó un incremento robusto en la respuesta oxidativa o inflamatoria. De hecho, Hastings y colaboradores (2023)

reportaron que las células persistentes de *P. aeruginosa* inducen inicialmente una polarización de macrófagos con características tipo M2, acompañada por menores niveles de citocinas proinflamatorias y mayor producción relativa de IL-10.

Las diferencias observadas entre la actividad oxidativa causada por *S. aureus* y *P. aeruginosa* persistentes sugieren estrategias distintas de interacción con la inmunidad innata. Mientras *S. aureus* pareció inducir una respuesta oxidativa e inflamatoria más intensa, *P. aeruginosa* mostró un perfil más compatible con inmunomodulación activa.

Por un lado, *S. aureus* aparentemente induce una fuerte activación de los macrófagos, asociada con elevadas concentraciones de ROS, favoreciendo posteriormente la selección de subpoblaciones tolerantes al estrés oxidativo para su posterior diseminación; mientras que modular la respuesta inflamatoria del hospedero y establecer infecciones persistentes de larga duración (Figura 18)

Aunque los resultados corresponden a un modelo exploratorio y requieren validación adicional mediante técnicas complementarias, los hallazgos apoyan la hipótesis de que la persistencia bacteriana puede ser inducida por desinfectantes y otros agentes oxidantes (Nordholt et al. 2021, 2024) y que este fenotipo podría alterar la dinámica funcional de la interacción hospedero-patógeno, favoreciendo estados de supervivencia intracelular e inclusive la modulación la respuesta inmune innata.

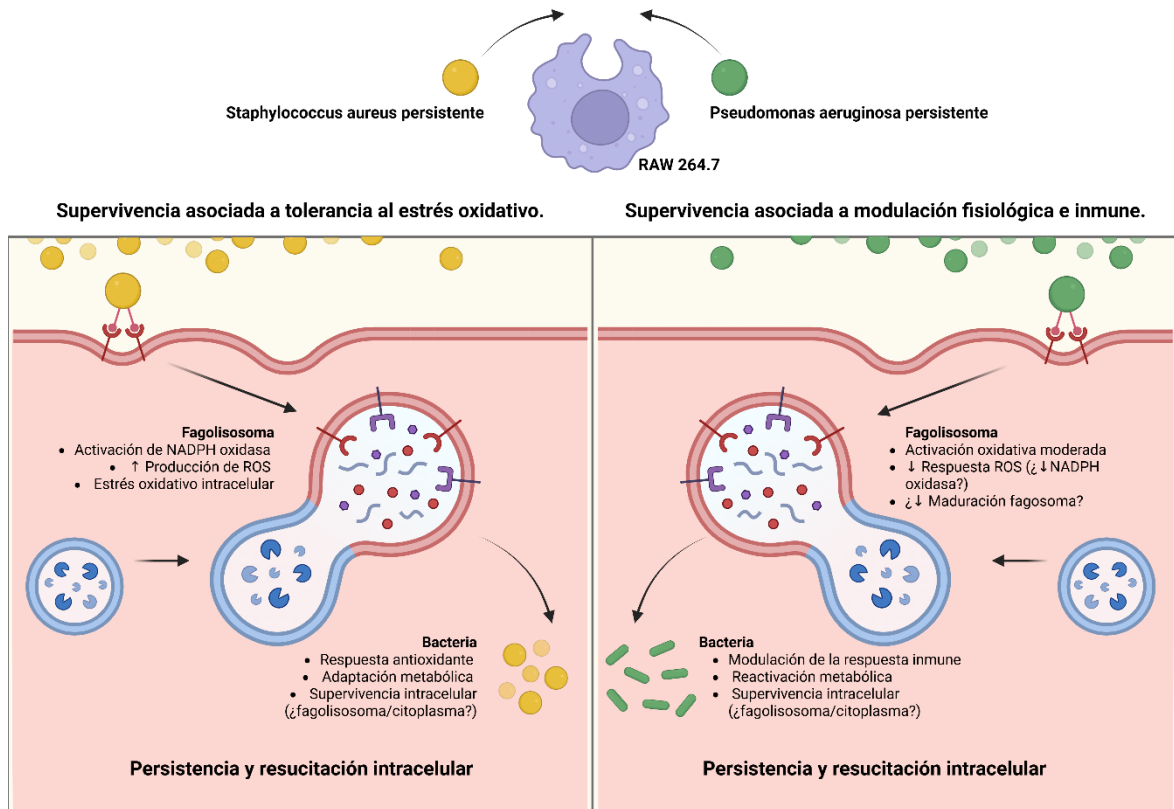


Figura 19. Modelos propuestos de supervivencia de *S. aureus* y *P. aeruginosa* persistentes

Nuestros resultados sugieren que la persistencia bacteriana influye de manera distinta dependiendo de la especie; por un lado, *S. aureus* persistente (izq) permite la activación de las vías oxidativas del fagolisosoma, con el fin de seleccionar aquellas subpoblaciones más persistentes para su posterior diseminación; mientras que *P. aeruginosa* (der) modula la respuesta oxidativa para generar nichos replicativos intracelulares y reactivar su metabolismo

9. CONCLUSIONES

1. La exposición a concentraciones subletales de hipoclorito de sodio favoreció la formación de subpoblaciones bacterianas tolerantes en *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, compatibles con un fenotipo persistente.
2. Las bacterias persistentes mostraron una mayor capacidad de supervivencia frente a mecanismos de la inmunidad innata, particularmente frente a la exposición al suero humano y durante la interacción con células fagocíticas.
3. Los resultados sugieren que el estado persistente no solamente implica tolerancia antimicrobiana, sino también adaptaciones fisiológicas asociadas con evasión inmunológica y resistencia al estrés oxidativo.
4. En *P. aeruginosa*, la limitada activación oxidativa observada incluso bajo estimulación con PMA sugiere la posible modulación de rutas de señalización celular asociadas con PKC y NADPH oxidasa, contribuyendo a una respuesta inflamatoria menos eficiente.
5. *S. aureus* mostró una interacción distinta con las células inmunes, caracterizada por una respuesta oxidativa más intensa, lo que podría favorecer la selección de subpoblaciones altamente tolerantes al estrés oxidativo y con capacidad de persistencia intracelular.
6. En conjunto, este trabajo aporta evidencia sobre la relación entre estrés oxidativo, persistencia bacteriana e inmunoevasión en dos patógenos clínicamente relevantes asociados con infecciones crónicas y recurrentes.

10. PERSPECTIVAS

- Caracterizar la expresión de genes asociados con persistencia, respuesta oxidativa y sistemas toxina-antitoxina en *P. aeruginosa* y *S. aureus* durante la exposición a estrés oxidativo.
- Analizar la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias durante la interacción entre macrófagos y bacterias persistentes para definir con mayor precisión los mecanismos de inmunomodulación.
- Evaluar la participación de rutas de señalización intracelular asociadas con PKC, PI3K/Akt y NF- κ B durante la infección con células persistentes de *P. aeruginosa*.
- Determinar si las bacterias persistentes presentan alteraciones en la activación, ensamblaje o actividad de la NADPH oxidasa en células fagocíticas.
- Investigar la capacidad de las células persistentes para sobrevivir intracelularmente a largo plazo y establecer nichos compatibles con infección crónica.
- Explorar estrategias terapéuticas dirigidas tanto contra bacterias persistentes como contra mecanismos de evasión inmunológica, incluyendo terapias combinadas antimicrobianas e inmunomoduladoras; por ejemplo, péptidos antimicrobianos.

10. ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA OBTENCIÓN, USO Y/O ALMACENAMIENTO DE MUESTRA BIOLÓGICA

Título de proyecto	Persistencia bacteriana inducida por estrés oxidativo en <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Staphylococcus aureus</i> y su impacto en la resp. inmune innata <i>in vitro</i> .
Nombre del Programa	Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología.
Nombre de Tesista	Gustavo Aaron Garza Hernández
Teléfono de contacto	8110362725

Por este medio se solicita la autorización para obtener, usar y/o almacenar sus muestras biológicas originales y/o sus remanentes que serán empleadas para el desarrollo de este proyecto de investigación que se llevará a cabo en Lab de Inmunología y Virología, FCB, UANL en el periodo de agosto 2024 - junio 2026.

Su participación consiste en la donación de una muestra de sangre venosa, que será utilizada exclusivamente para realizar opsonización de bacterias, con el fin de evaluar capacidad de fagocitosis de macrófagos RAW 264.7.

SÍ	NO	OPCIÓN
☒	☐	Acepto que se me realice el procedimiento para la obtención de muestras biológicas y su uso en el proyecto.
☒	☐	Acepto que se guarden mis muestras biológicas el tiempo necesario para el desarrollo del proyecto.

He leído y comprendido la información anterior. He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas han sido respondidas satisfactoriamente. Acepto participar de forma voluntaria.

Nombre del participante: César Giovanni Esquivel Paredes.

Firma: [Firma] Fecha: 12/02/2026

11. BIBLIOGRAFÍA

- Ayrapetyan, M, Williams, T C, Baxter, R, and Oliver, J D. 2015. Viable but Nonculturable and Persister Cells Coexist Stochastically and Are Induced by Human Serum. *Infection and Immunity*, 83(11), 4194–4203. <https://doi.org/10.1128/IAI.00404-15>
- Ayrapetyan, M, Williams, T C, and Oliver, J D. 2015. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends in Microbiology*, 23(1), 7–13. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.09.004>
- Balaban, N Q, Merrin, J, Chait, R, Kowalik, L, and Leibler, S. 2004. Bacterial Persistence as a Phenotypic Switch. *Science*, 305(5690), 1622–1625. <https://doi.org/10.1126/science.1099390>
- Beam, J E, Wagner, N J, Shook, J C, Bahnson, E S M, Fowler, V G, Rowe, S E, and Conlon, B P. 2021. *Macrophage-produced peroxynitrite induces antibiotic tolerance and supersedes intrinsic mechanisms of persister formation*. <https://doi.org/10.1101/2021.05.20.445079>
- Chen, S, Li, X, Wang, Y, Zeng, J, Ye, C, Li, X, Guo, L, Zhang, S, and Yu, X. 2018. Induction of *Escherichia coli* into a VBNC state through chlorination/chloramination and differences in characteristics of the bacterium between states. *Water Research*, 142, 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.05.055>
- de Oliveira Santos, J V, da Costa Júnior, S D, de Fátima Ramos dos Santos Medeiros, S M, Cavalcanti, I D L, de Souza, J B, Coriolano, D L, da Silva, W R C, Alves, M H M E, and Cavalcanti, I M F. 2022. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. *Current Microbiology*, 79(6), 175. <https://doi.org/10.1007/s00284-022-02875-9>
- Fisher, R A, Gollan, B, and Helaine, S. 2017. Persistent bacterial infections and persister cells. *Nature Reviews Microbiology*, 15(8), 453–464. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.42>
- Flores-Paredes, W, Luque, N, Alborno, R, Rojas, N, Espinoza, M, Pons, M J, and Ruiz, J. 2021. Evolution of Antimicrobial Resistance Levels of ESKAPE Microorganisms in a Peruvian IV-Level Hospital. *Infection & Chemotherapy*, 53(3), 449. <https://doi.org/10.3947/ic.2021.0015>
- Garai, P, Berry, L, Moussouni, M, Bleves, S, and Blanc-Potard, A-B. 2019. Killing from the inside: Intracellular role of T3SS in the fate of *Pseudomonas aeruginosa* within macrophages revealed by mgtC and oprF mutants. *PLOS Pathogens*, 15(6), e1007812. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007812>

- Gollan, B, Grabe, G, Michaux, C, and Helaine, S. 2019. Bacterial Persisters and Infection: Past, Present, and Progressing. *Annual Review of Microbiology*, 73(1), 359–385. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-020518-115650>
- Grant, S S, and Hung, D T. 2013. Persistent bacterial infections, antibiotic tolerance, and the oxidative stress response. *Virulence*, 4(4), 273–283. <https://doi.org/10.4161/viru.23987>
- Hastings, C J, Himmler, G E, Patel, A, and Marques, C N H. 2023. Immune Response Modulation by *Pseudomonas aeruginosa* Persister Cells. *MBio*, 14(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00056-23>
- Kaldalu, N, Hauryliuk, V, Turnbull, K J, La Mensa, A, Putrinš, M, and Tenson, T. 2020. In Vitro Studies of Persister Cells. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 84(4). <https://doi.org/10.1128/MMBR.00070-20>
- Kember, M, Grandy, S, Raudonis, R, and Cheng, Z. 2022. Non-Canonical Host Intracellular Niche Links to New Antimicrobial Resistance Mechanism. *Pathogens*, 11(2), 220. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020220>
- Li, M, Long, Y, Liu, Y, Liu, Y, Chen, R, Shi, J, Zhang, L, Jin, Y, Yang, L, Bai, F, Jin, S, Cheng, Z, and Wu, W. 2016. HigB of *Pseudomonas aeruginosa* Enhances Killing of Phagocytes by Up-Regulating the Type III Secretion System in Ciprofloxacin Induced Persister Cells. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00125>
- Liao, X, Hu, W, Liu, D, and Ding, T. 2021. Stress Resistance and Pathogenicity of Nonthermal-Plasma-Induced Viable-but-Nonculturable *Staphylococcus aureus* through Energy Suppression, Oxidative Stress Defense, and Immune-Escape Mechanisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 87(2). <https://doi.org/10.1128/AEM.02380-20>
- Loyola-Cruz, M Á, Durán-Manuel, E M, Cruz-Cruz, C, Márquez-Valdelamar, L M, Bravata-Alcántara, J C, Cortés-Ortíz, I A, Cureño-Díaz, M A, Ibáñez-Cervantes, G, Fernández-Sánchez, V, Castro-Escarpulli, G, and Bello-López, J M. 2023. ESKAPE bacteria characterization reveals the presence of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in COVID-19/VAP patients. *American Journal of Infection Control*, 51(7), 729–737. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2022.08.012>
- Mina, E G, and Marques, C N H. 2016. Interaction of *Staphylococcus aureus* persister cells with the host when in a persister state and following awakening. *Scientific Reports*, 6(1), 31342. <https://doi.org/10.1038/srep31342>

- Niu, H, Gu, J, and Zhang, Y. 2024. Bacterial persisters: molecular mechanisms and therapeutic development. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 174. <https://doi.org/10.1038/s41392-024-01866-5>
- Nordholt, N, Kanaris, O, Schmidt, S B I, and Schreiber, F. 2021. Persistence against benzalkonium chloride promotes rapid evolution of tolerance during periodic disinfection. *Nature Communications*, 12(1), 6792. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27019-8>
- Nordholt, N, Sobisch, L-Y, Gödt, A, Lewerenz, D, and Schreiber, F. 2024. Heterogeneous survival upon disinfection underlies evolution of increased tolerance. *Microbiology Spectrum*, 12(12). <https://doi.org/10.1128/spectrum.03276-22>
- OMS. 2024. *WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance*. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf>
- Rampersad, S N. 2012. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. *Sensors*, 12(9), 12347–12360. <https://doi.org/10.3390/s120912347>
- RHOVE. 2025. *Panorama Epidemiológico de las IAAS Octubre 2025*. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/1043754/PanoEpid_delas_IAAS_No_10_202510.pdf
- Rice, L B. 2008. Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081. <https://doi.org/10.1086/533452>
- Rozman, U, Pušnik, M, Kmetec, S, Duh, D, and Šostar Turk, S. 2021. Reduced Susceptibility and Increased Resistance of Bacteria against Disinfectants: A Systematic Review. *Microorganisms*, 9(12), 2550. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122550>
- Sim Choi, H, Woo Kim, J, Cha, Y, and Kim, C. 2006. A Quantitative Nitroblue Tetrazolium Assay for Determining Intracellular Superoxide Anion Production in Phagocytic Cells. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 27(1), 31–44. <https://doi.org/10.1080/15321810500403722>
- Stapels, D A C, Hill, P W S, Westermann, A J, Fisher, R A, Thurston, T L, Saliba, A-E, Blommestein, I, Vogel, J, and Helaine, S. 2018. *Salmonella* persisters undermine host immune defenses during antibiotic treatment. *Science*, 362(6419), 1156–1160. <https://doi.org/10.1126/science.aat7148>

- Terada, L S, Johansen, K A, Nowbar, S, Vasil, A I, and Vasil, M L. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* Hemolytic Phospholipase C Suppresses Neutrophil Respiratory Burst Activity. *Infection and Immunity*, 67(5), 2371–2376.
<https://doi.org/10.1128/IAI.67.5.2371-2376.1999>
- Vega, N M, Allison, K R, Khalil, A S, and Collins, J J. 2012. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nature Chemical Biology*, 8(5), 431–433.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.915>
- Wu, Y, Li, D, Wang, Y, Chen, K, Yang, K, Huang, X, Zhang, Y, and Wu, M. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* promotes autophagy to suppress macrophage-mediated bacterial eradication. *International Immunopharmacology*, 38, 214–222.
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.04.044>
- Ye, C, Lin, H, Zhang, M, Chen, S, and Yu, X. 2020. Characterization and potential mechanisms of highly antibiotic tolerant VBNC *Escherichia coli* induced by low level chlorination. *Scientific Reports*, 10(1), 1957. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58106-3>
- Zumaya-Estrada, F A, Ponce-de-León-Garduño, A, Ortiz-Brizuela, E, Tinoco-Favila, J C, Cornejo-Juárez, P, Vilar-Compte, D, Sassoé-González, A, Saturno-Hernandez, P J, and Alpuche-Aranda, C M. 2021. Point Prevalence Survey of Antimicrobial Use in Four Tertiary Care Hospitals in Mexico. *Infection and Drug Resistance*, Volume 14, 4553–4566. <https://doi.org/10.2147/IDR.S327721>