RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS OCASIONADA POR BOMBAS DE EFLUJO. IMPACTO EN LA MULTIRRESISTENCIA

Marchetti ML[1,2], Errecalde J*[1], Mestorino N[1]

[1]*Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.*
[2]*Beca Doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET.*

RESUMEN:*La resistencia a los antimicrobianos representa un severo problema a nivel mundial. Se han descripto variados mecanismos de resistencia, entre los cuales se encuentran las bombas de eflujo. Estas son proteínas transportadoras de membrana, organizadas en superfamilias y distribuidas ubicuamente entre organismos procariotas y eucariotas. Los genes que codifican para las bombas de eflujo pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o bien en elementos genéticos transmisibles como los plásmidos. Algunos sistemas tienen la capacidad de expulsar antimicrobianos estructuralmente disímiles (Multiple Drug Resistance: MDR). La presencia de los mismos en combinación con otros mecanismos genera altos niveles de resistencia entre patógenos y comensales originando un consecuente fracaso terapéutico. Debido a la creciente importancia de este mecanismo de defensa microbiano se están investigando diversas estrategias para modificar y revertir la resistencia bacteriana por eflujo.*

Palabras clave: Multirresistencia – antimicrobiano – bomba de eflujo – bacterias

BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE BY EFFLUX PUMPS. MULTIDRUG RESISTANCE IMPACT

ABSTRACT: *Bacterial antimicrobial resistance is a serious problem worldwide. Several mechanisms of resistance have been described, among which are efflux pump systems. These systems are constituted by protein transporters organized in superfamilies and ubiquitously distributed among eukaryote and prokaryote organisms. The genes encoding efflux pumps can be found in the bacterial chromosome or in transmissible genetic elements such as plasmids. Some efflux pump systems may transport structurally dissimilar antimicrobial agents (Multiple Drug Resistance: MDR). Antibiotic efflux in association with other resistance mechanisms could confer high resistance level in commensal and pathogen bacteria causing consequent therapeutic failures. Due to the increasing importance of this microbial defense mechanism, several strategies to modify and reverse bacterial resistance by efflux pumps are currently being explored.*

Key words: Multidrug resistance – antimicrobial – efflux pump – bacteria

Fecha de recepción: 09/05/11 Fecha de aprobación: 20/10/11

Dirección para correspondencia: Nora Mestorino, *Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.* CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.
E-mail: *noram@fcv.unlp.edu.ar*

INTRODUCCIÓN

Poco tiempo luego del inicio de la era de los antimicrobianos, cuando los efectos de los antibióticos sobre las bacterias fueron descriptos por primera vez, el fenómeno de resistencia microbiana comenzó a ser notado por diferentes investigadores. Sin embargo, fue tomado más como una curiosidad que como un hecho clínico de trascendencia (1).

Ante la llegada de un nuevo antimicrobiano a la clínica, es muy probable que ya existan variedades bacterianas capaces de resistir a su acción, o que estas aparezcan y se seleccionen con velocidad variable, la que únicamente podrá ser controlada y demorada a través del uso racional de los antimicrobianos, ya que seguramente no se podrá evitar su emergencia (1, 2).

Actualmente, la antibióticorresistencia genera preocupación en los más elevados niveles de decisión mundial, pues resulta un problema extremadamente severo para la salud pública. La OMS, OIE y FAO han emitido documentos conjuntos fijando posición y haciendo recomendaciones a los países miembros (Joint Workshops Ginebra 2003, Oslo 2004, Seúl 2006, Roma 2007).

Básicamente la transmisión de la resistencia se produce por mutación, pero fundamentalmente por adquisición de material genético exógeno tanto en bacterias patógenas como en aquellas pertenecientes a la flora comensal de hombres y animales (3, 4). La transmisibilidad de los factores de resistencia, sumado a la aparición de fenotipos bacterianos que expresan resistencia a un amplio rango de quimioterápicos químicamente disímiles al mismo tiempo, puede dar lugar a un problema aún mayor que es *la multirresistencia* (5, 6).

Existen determinados tipos de infecciones en seres humanos, generadas por gérmenes multirresistentes, para las que ya no hay terapia eficaz. Las causas provienen de la mala utilización de los antimicrobianos (uso innecesario, dosis bajas, intervalos incorrectos, tratamientos cortos, etc.), a lo que se le suma en Medicina Veterinaria el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento, sobre todo en explotaciones intensivas.

El objetivo central de esta revisión es describir el mecanismo de resistencia bacteriana a los antimicrobianos por bombas de eflujo, a los efectos de conocer su estructura, regulación, localización e importancia, para así concientizar acerca del verdadero impacto de estos sistemas como generadores de multirresistencia tanto .en microorganismos comensales, como en patógenos.

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los microorganismos viven íntimamente en contacto con el medio ambiente. Tanto los comensales como los patógenos deben protegerse frente a los agentes agresores específicos e inespecíficos del huésped. Por ello, no resulta sorprendente que las especies unicelulares hayan desarrollado una amplia y elaborada gama de defensas frente a los mismos a fin de reducir o prevenir la acumulación de sustancias nocivas no deseadas.

A través de la evolución de los microorganismos se han ido seleccionando verdaderos mecanismos de defensa frente a los efectos tóxicos de los antimicrobianos y otros fármacos. Uno de estos mecanismos involucra la producción de enzimas hidrolíticas capaces de inactivar directamente al antimicrobiano en cuestión como es el ejemplo de las β-lactamasas, o bien enzimas que transforman a la molécula en un derivado sin actividad intrínseca como ocurre con las enzimas que fosforilan o acetilan a los aminoglucósidos (7, 8). Otro mecanismo es la alteración química de la diana sobre la que actúa el antibiótico por mutación o modificación enzimática, que usualmente suele ser una enzima metabólica esencial de la bacteria, o la expresión de una molécula diana alternativa no factible de ser inhibida por la acción del principio químico (9, 10). El tercer mecanismo es la modificación de la permeabilidad, ya sea por disminución de la permeabilidad natural de la membrana externa con modificaciones en el tamaño o número de las porinas, o bien por excreción activa del antibiótico acumulado en la célula a través de las proteínas que conforman los sistemas de eflujo (11, 12).

¿QUE SON LAS BOMBAS DE EFLUJO?

Las bombas de eflujo son transportadores de membrana involucrados generalmente en la extrusión de sustancias tóxicas desde el interior de las células hacia el medio externo. Estas proteínas se encuentran presentes en microorganismos grampositivos, gramnegativos y eucariotas. Las células bacterianas y las eucariotas tienen variados sistemas transportadores de membrana con múltiples funciones vitales como ingreso de nutrientes, excreción de sustancias tóxicas y mantenimiento de la homeostasis (12, 13).

En las bacterias productoras de antibióticos, los sistemas de eflujo les confieren autoinmunidad, así como también les otorga protección contra las sustancias agresoras con capacidad antimicrobiana presentes en su medio ambiente natural. Sin embargo, la mayoría de los sistemas bacterianos de eflujo parecen tener roles en otros procesos como la comunicación intercelular y la exportación de sustancias tóxicas como se mencionó previamente (14).

Todos los genomas bacterianos estudiados contienen diversidad de bombas de eflujo, claro indicio de su origen ancestral. Se ha estimado que

entre el 5 -10% de todos los genes están involucrados en el transporte y una gran proporción de los mismos codifica para bombas de eflujo (6).

Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato, o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicamente diferentes, incluyendo antimicrobianos de múltiples clases (de allí el término Multiple Drug Resistance: MDR). En este último caso las bombas pueden estar asociadas con múltiple resistencia antimicrobiana. Estas han resultado ser un grave problema en la antibióticoterapia, ya que la presencia de bombas tipo MDR en una célula bacteriana puede implicar disminución de la susceptibilidad a un amplio rango de quimioterápicos químicamente disímiles al mismo tiempo (6).

Una característica llamativa de estos sistemas es su ubicuidad. Hay sistemas que solo están presentes en algunas cepas de una especie bacteriana, pero la gran mayoría se encuentran en el genoma de todos los individuos pertenecientes a dicha especie (15).

Reconocen un gran número de compuestos farmacológicos no relacionados entre sí, debido a que la identificación del sustrato está basada en las propiedades físico-químicas (hidrofobicidad, aromaticidad, capacidad de ligar hidrógeno y carácter ionizable) y no en propiedades químicas definidas, como ocurre en el caso de enzima-sustrato o reconocimiento de ligando-receptor (16).

El hecho de que los sistemas MDR sean ubicuos e intervengan en el bombeo de numerosos antibióticos los convierte en blancos ideales para la búsqueda de nuevos inhibidores bacterianos, que hagan que las bacterias que portan estos sistemas sean más sensibles a los antibióticos actualmente existentes en el repertorio clínico. Se ha demostrado que la inactivación de dichos sistemas mutantes de *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* produce un descenso en las concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs) de distintos antibióticos (17).

SISTEMAS DE EFLUJO

FAMILIAS DE BOMBAS Y ORGANIZACIÓN

Los sistemas de eflujo están agrupados en familias de proteínas transportadoras basadas en la homología de las secuencias de aminoácidos, las similitudes en el tamaño y las estructuras secundarias (12).

Filogenéticamente las bombas de eflujo pertenecen a cinco superfamilias denominadas: (1) familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, ATP *binding cassette*); (2) superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*); (3) familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, *multidrug and toxic-compound* extrusion); (4) familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, *small multidrug resistance*); y (5) familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*). ABC y MFS son las familias mayores y se piensa que pueden tener un origen común. La primera está conformada por transportadores activos primarios cuya actividad depende de la captación e hidrólisis de ATP, mientras que las superfamilias SMR, MATE, MFS, RND son transportadores secundarios, pues su actividad se lleva a cabo por gradiente de protones (6, 18). Un mínimo de 12 segmentos de transmembrana en su estructura son requeridos para poder llevar a cabo dicha actividad (18).

Dos de estas superfamilias: la familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, ATP *binding cassette*) y la superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*), se encuentran distribuidas ubicuamente entre organismos procariotas y eucariotas. RND, SMR y MATE están descriptas únicamente en procariotas. Sin embargo, cabe destacar que muchos transportadores han sido recientemente identificados, en consecuencia no sería extraño que se descubran más familias que pertenezcan tanto a los procariotas como a los eucariotas (16).

Las bombas de la superfamilia ABC (ATP Binding Cassette), son transportadores primarios presentes en las células eucariotas, eubacteria, archaeabacteria. Estas bombas utilizan como fuente de energía la hidrólisis de moléculas de ATP. Esta superfamilia comprende dos clases de proteínas diferentes, las denominadas tipo-procariota (PK-type) y las tipo-eucariota (EK-type). Muchos estudios se enfocan principalmente en la caracterización de este último tipo debido al gran potencial en el campo médico y farmacológico humano. Ambas clases se distinguen en cuanto a su organización genética y sus dominios. PK-type consiste en tres componentes: (1) dos proteínas integrales con seis segmentos transmembranosos, (2) dos proteínas periféricas que capturan e hidrolizan ATP, y (3) una proteína periplásmica donde se une el sustrato. Por otro lado, en un transportador ABC EK-type, la proteína de transmembrana y la que se une al ATP están fusionadas y el transportador consiste en dos cadenas polipeptídicas conteniendo cada una un dominio de transmembrana y un dominio de unión a ATP. Quedan finalmente dos dominios hidrofóbicos de localización membranosa y dos hidrofílicos localizados en la interfase citoplasmática. En las bacterias, los transportadores tipo ABC poseen alta especificidad por el sustrato que incluye azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, complejos orgánicos de hierro, vitaminas y antimicrobianos. En el hombre, las proteínas ABC que confieren resistencia a los antitumorales

incluyen a la P-glicoproteína (MDR1) y las proteínas de multirresistencia 1 y 2 (MRP1 y MRP2) (Tabla I) (14, 16, 19, 20).

Los transportadores secundarios de la superfamilia MFS, al igual que los anteriores pueden observarse en bacterias grampositivas, gramnegativas y células eucariotas de algunos mamíferos (21). Se han identificado más de 300 proteínas pertenecientes a esta familia. Representa uno de los grupos más extensos dentro de los transportadores secundarios. Estudios recientes demuestran que en general tienen una estructura conformada por dos dominios proteicos que constituyen un poro de translocación central. Tienen de 12 a 14 segmentos de transmembrana con un sitio de unión al sustrato simple conteniendo un residuo cargado para la unión del protón que será intercambiado por dicho sustrato. Este podría ser un residuo conservado de arginina involucrado en el reconocimiento de las cargas positivas (18).

En cuanto a la familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*), esta es exclusiva de microorganismos gramnegativos, contando con un espectro de acción amplio, pudiendo reconocer una amplia variedad de sustratos entre ellos antibióticos, así como también otros agentes farmacológicos como detergentes y antisépticos (22). Los miembros de la superfamilia RND muestran características topológicas comunes, tienen dos lazos, prolongaciones extracitoplasmáticas o "loops" y 12 segmentos de transmembrana (18). Están organizados a modo de sistemas multicompuestos, en los cuales la bomba de eflujo propiamente dicha se encuentra ubicada en la membrana interna y trabaja conjuntamente con una proteína periplásmica de fusión (MFP o Membrana Fusion Protein) que actúa como nexo de unión entre la bomba de eflujo y una proteína de la membrana o porina (OMP: Outer Membrane Protein) situada como su nombre lo dice en la membrana externa (Fig 1) (21, 23, 24, 25).

Un ejemplo de sistema de eflujo perteneciente a la familia RND es el de acrAB en *E. coli.* Su sobreexpresión implica un incremento en el número presente de bombas de eflujo con resistencia a variados sustratos como sales biliares y antimicrobianos entre otros. AcrA es la proteína periplasmática de fusión miembro de la familia de las proteínas de fusión de membrana (MFP: Membrana Fusion Protein) y AcrB es el transportador transmembrana (CMP) perteneciente a la

Tabla I. Clasificación y distribución de los sistemas de eflujo en los organismos procariotas y eucariotas. Adaptado de Van Bambeke et al, 2003.

PROCARIOTA	EUCARIOTA
MFS (Mayor Facilitator Family)	
DHA1(TetA,B,E de *E.coli;* NorA de *S. aureus*) DHA2(EmrB de *E.coli)* DHA3 (MefE de *P. aeruginosa*) SET (SetA de *E..coli*)	
RND (Resistance Nodulation Division))	
HAE1 (Acr de *E.coli* Mex de *P aeruginosa)* HAE2	
DTM (Drug Metabolite Transporter H^+ - antiporter))	
SMR (Smalll Multidug Resistance)	
POT (Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysacharide Flippase	
MATE (Multi Antimicrobial Extrudion)	
ABC (ATP Binding Cassette)	
Drug E1 DrugE2 DrugE3 DrugRA2 MacB	MDR $CT2^-$

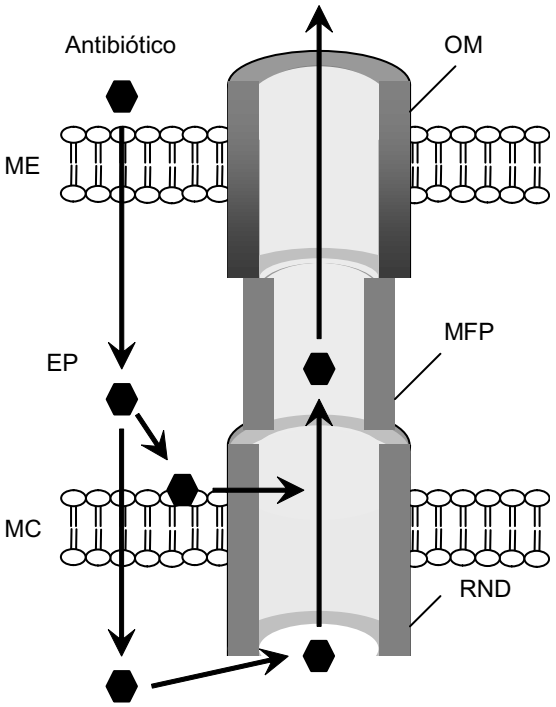

Figura 1. Representación esquemática de la estructura y función de los sistemas de eflujo RND en bacterias gramnegativas. Los antimicrobianos pueden ser capturados desde el espacio periplásmico (EP), la membrana citoplasmática (MC) y/o el espacio citoplasmático (EC) por este tipo de transportadores. ME: membrana externa. OM: proteína de membrana externa tipo porina. MFP: proteína periplásmica de fusión. RND: proteína transportadora (23).

familia RND. AcrAB de *E.coli* son cercanamente homólogas a MexAB de *P. aeruginosa*. El *operon acrAB* no contiene ningún gen que codifique para una proteína de membrana externa (OMP: Outer Membrane Protein). Sin embargo, AcrAB se encuentra asociado a un OMP denominado TolC que sirve como canal o porina para más de un sistema de exportación de tipo proteico. El sistema AcrAB-TolC constituye un sistema proteico tripartito encargado del eflujo de sustratos a través de las dos membranas de los microorganismos gramnegativos (17, 26).

AcrAB-TolC es capaz de transportar a más de cinco antibióticos diferentes. Fisiológicamente es un transportador de sales biliares, esto ilustra bien el concepto de que los antibióticos no son sustratos oportunistas de sistemas de transporte indispensables para la vida bacteriana en el medio ambiente natural (24).

ESTRUCTURA GENERAL DE LOS SISTEMAS DE EFLUJO

- EFLUJO A TRAVÉS DE UNA MEMBRANA SIMPLE

El sistema descripto en las bacterias grampositivas consta de una única proteína situada en la membrana (CMP: Proteína de Membrana Citoplasmática). Esta proteína expulsa los fármacos del interior celular, ya sea acoplada al potencial de membrana, o bien mediante la energía obtenida por hidrólisis de ATP. Este sistema de bombeo tiene como limitación la especificidad de sustrato, pues para garantizar su eficiencia es indispensable que la velocidad de ingreso del fármaco no supere en ningún momento a la de la expulsión (21, 25).

En el caso particular de los microorganismos gramnegativos, existen transportadores de eflujo de *membrana simple*, las bombas mueven agentes desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico. Esta es una operación ineficiente porque las moléculas lipofílicas inhibidoras difundirán espontáneamente de regreso al citoplasma a través de la bicapa lipídica. Sin embargo, se ha demostrado que la bomba Tet bombea tetraciclina al espacio periplásmico de *E. coli*. Podría crear altos niveles de resistencia solamente por tener una velocidad de eflujo que supere altamente al retorno de la droga hacia el citoplasma. Este tipo de bomba tiene un espectro reducido en general a un único antimicrobiano (25).

Es decir pueden encontrarse dos tipos de proteínas transportadoras según el microorganismo al que pertenecen:

Proteína transportadora con un solo componente en su estructura que cataliza el eflujo de drogas a través de la membrana citoplasmática de bacterias grampositivas. Las cuales pueden ser específicas para un sustrato o bien MDR. Este a su vez es energizado por gradiente de protones o bien por hidrólisis de ATP (transportadores ABC) (Fig. 2A) (14, 25).

Un transportador con un solo componente en su estructura que cataliza el eflujo de drogas a través de la membrana citoplásmatica de bacterias gramnegativas. Este tipo de bombas excreta las drogas dentro del espacio periplásmico. Pueden pertenecer tanto a la familia MFS (proteínas Tet) o bien a la SMR (MvrC). Ambas energizadas por gradiente de protones (Fig. 2B) (14, 25).

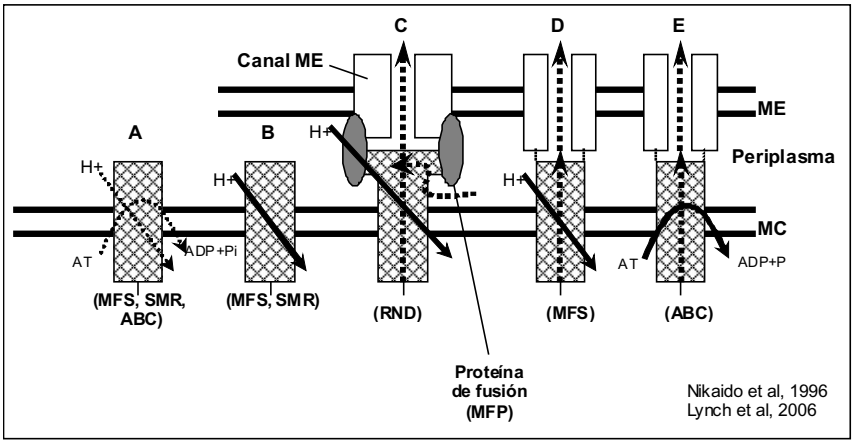

Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de transportadores. (A) Transportador simple que cataliza el eflujo a través de la membrana citoplasmática (MC) en bacterias grampositivas, energizado por gradientes de protones (MFS –SMR) o bien por hidrólisis de ATP (ABC). (B) Transportador simple en bacterias gramnegativas que excretan los sustratos hacia el espacio periplásmico (MFS-SMR). (C) Transportador multicompuesto tipo RND en bacterias gramnegativas, energizado por gradiente de protones y estructura tripartita con canales de membrana externa (canal ME) y proteínas de fusión periplásmica. (D)Transportadores multicompuesto tipo MFS en bacterias gramnegativas. (E) Transportador multicompuesto tipo ABC energizado por hidrólisis de ATP (14, 25).

- EFLUJO A TRAVÉS DE UN SISTEMA DOBLE DE MEMBRANAS

En el caso del eflujo en *sistemas de doble membrana*, la droga es conducida desde el citoplasma hacia el exterior de la célula por el sistema de tres proteínas que forman el canal de salida. Estos sistemas multicompuestos, incluyen a AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa* perteneciente a la superfamilia RND, con capacidad de bombear al exterior una extraordinaria variedad de antibióticos, detergentes, secantes y agentes quimioterápicos (25).

En este grupo pueden encontrarse:

Proteínas transportadoras MDR tipo RND en bacterias gramnegativas. Cuya estructura esta dada por una bomba de eflujo que puede pertenecer ya sea a la familia RND (Fig. 2C) o bien a la MFS (Fig. 2D), una porina de membrana externa (OM) y una proteína periplásmica de conexión entre las dos anteriores. Están energizadas por gradientes de protones (14, 25).

Proteínas transportadoras MDR tipo ABC en bacterias gramnegativas. De estructura similar a la anterior excepto que la bomba de eflujo pertenece a la familia ABC,y se encuentra energizada por hidrólisis de ATP (Fig. 2E) (14, 25).

MECANISMOS DE ACCION DE LAS BOMBAS

Han sido propuestos muchos modelos para explicar las posibles rutas de los transportadores:

La hipótesis de "la aspiradora hidrofóbica" asume que los transportadores están embebidos en los fosfolípidos de la bicapa membranosa, el sustrato se mueve libremente en la fase lipídica, desde allí alcanzan el canal central de la bomba proteica ya sea desde el lado interno o externo de la membrana y por último, son "aspirados", activamente expulsados hacia el exterior (12, 18).

La segunda hipótesis, es la de "flippase" que sostiene que el sustrato alcanza la bomba proteica también desde dentro de la membrana y simplemente difunde hacia el exterior pasando desde la porción interna hacia la externa (12, 18).

La tercera hipótesis es la del "poro acuoso" en la cual se asume que la traslocación incluye el transporte del sustrato desde el citoplasma hacia el medio externo a través de poros acuosos con sitios flexibles de reconocimiento de sustrato (12).

El mecanismo de acción de los sistemas de eflujo puede incluir los siguientes pasos, según un modelo de mutagénesis realizado sobre transportadores de la familia SMR:

intercambio entre la droga sustrato y un protón unido a un residuo cargado en el lado interno de la membrana

traslocación del sustrato tras una serie de cambios conformacionales de la proteína transportadora, que conducen al mismo a través de un canal hidrofóbico

reemplazo del sustrato por el protón en el medio externo y retorno al estado conformacional inicial. El resultado final es un intercambio entre el sustrato y el protón (antiporte)

En los transportadores de la familia SMR el residuo cargado puede ser un glutamato conservado. Este mismo mecanismo puede ser aplicado para los transportadores MFS, pero el residuo cargado es de tipo arginina. Estos modelos que involucran a un residuo acídico, explicarían porque ambos grupos de transportadores expulsan preferentemente, moléculas catiónicas. En cuanto a los miembros de la superfamilia RND se conoce menos acerca de esta característica, sin embargo, estos poseen grandes residuos cargados conservados en sus segmentos transmembranosos, que seguramente juegan un importante rol en la captación e intercambio del sustrato como se encuentra representado en la figura 2 (18).

Por otra parte, se ha sugerido que el transporte de sustratos en estos sistemas ocurre no solamente desde la fase citosólica de la membrana, como ha sido descripto en eucariotas o bacterias grampositivas, sino que también ocurre tanto desde la porción interna como de la externa de la membrana citoplasmática de los microorganismos gramnegativos. Esto sugiriere un movimiento de sustratos no solamente desde el citosol, sino también desde el periplasma (18).

Sucesivos estudios han demostrado que la especificidad por los sustratos y el sitio de unión a los mismos en los transportadores de la superfamilia RND, se encuentran presumiblemente en el dominio periplásmico (prolongaciones "loops") del transportador y no en su dominio de localización transmembranosa (25).

ORGANIZACIÓN GENETICA, EXPRESION Y REGULACION DE LAS BOMBAS DE EFLUJO MDR

La manifestación de un fenotipo MDR no siempre se debe a la expresión de funciones codificadas en un locus simple, ni tampoco necesariamente es resultado de un sistema específico para bombas de eflujo.

En muchos casos los elementos genéticos que codifican la expresión de las bombas se encuentran localizados en plásmidos (transportadores Tet en bacterias grampositivas), o en transposones conjugativos o transformables localizados en dichos plásmidos (transportadores Tet de bacterias gramnegativas) (16).

Pero también ocurre que los genes pueden localizarse en el cromosoma bacteriano como ocurre con los transportadores Acr de *E. coli*

y Mex de *P. aeruginosa* (16). En este caso, la localización en el DNA cromosómico confiere a las bacterias un mecanismo intrínseco que les permite sobrevivir en medios hostiles (en presencia de antibiótico). Las bacterias mutantes que puedan sobreexpresar los genes de las bombas pueden ser seleccionadas sin la adquisición de nuevo material genético (6).

En muchos casos, los genes que codifican para las bombas de eflujo forman parte de un operón, con genes reguladores que controlan la expresión de los mismos. En *E. coli* el operón *acrAB* codifica la proteína de fusión de membrana AcrA y el transportador AcrB, y el gen *tolC,* la proteína de membrana externa TolC, constituyendo así el sistema tripartito funcional RND, mencionado previamente (17, 26, 27).

La organización de los genes que codifican sistemas tripartitos de eflujo es relativamente similar en diferentes especies bacterianas. Típicamente, los genes se encuentran agrupados en operones: los genes reguladores se ubican adyacentes a los que codifican la proteína periplásmica de fusión, la cual a su vez está junto a los que codifican la bomba de eflujo propiamente dicha o transportador, y por último a su lado se encuentran aquellos de la OMP. La proteína periplásmica de fusión es usualmente cotranscripta con la del transportador. Por el contrario, para algunos sistemas y/o especies, la OMP no esta colocada en conjunto con los otros genes mencionados (27).

Se han realizado numerosos estudios sobre los mecanismos de regulación de las bombas de eflujo en cepas mutantes de laboratorio que permiten describirlos en cuatro grupos diferentes (27):

Mutaciones en un gen represor local: La sobreexpresión de las bombas de eflujo pueden ser el resultado de mutaciones en un gen represor. Muchos genes que codifican para la expresión de bombas de eflujo MDR se encuentran localizados dentro de operones que están bajo el control de genes represores locales. El gen regulador local se sitúa generalmente adyacente al gen o genes del transportador MDR. Por ejemplo, en el caso de *E. coli,* AcrA y AcrB se hallan cotranscriptos y bajo la regulación de *acrR.* Mutaciones en *acrR,* desreprimen la expresión de *acrB.* Lo mismo puede ocurrir con genes *acr* de otras especies bacterianas que sufren mutaciones de este tipo como *Salmonella entérica* serovar Typhimurium y *Enterobacter aerogenes* (28, 29).

Mutaciones en genes reguladores globales: Otra manera que permite que se produzca la sobreexpresión de bombas de eflujo es mediante la activación de un regulón u operón, controlado por un regulador transcripcional. En *E. coli,* por ejemplo, la expresión de *acrAB* en cepas mutantes con fenotipo MDR, está controlada por el operón *marRAB* o *soxRS.* La expresión constitutiva de *marRAB* en *E. coli,* produce un fenotipo MDR por medio *de la a*ctivación de locus genéticos múltiples en respuesta a las prot*eínas* regu*la*doras del oper*ón. No*rmalmente *marRAB* es repr*imido por* el represor transcripcional MarR*, pr*oteína que produce una acción reguladora negativa sobre el operón. Pe*ro por otra parte, pue*de ser desreprimido po*r activadores transcri*pcionales globales como MarA o SoxS, así como por varios compuestos tales como tetracilinas, cloranfenicol y salicilatos. La función de MarB todavía no se conoce (17, 27, 30, 31).

Mutaciones en regiones promotoras de los genes que codifican transportadores: El gen *norA* localizado en el cromosoma de *S. aureus* codifica la bomba de eflujo MDR NorA. Se ha identificado que su sobreexpresión por mut*ación de l*a región de *c*ontrol transcri*pcional* o promotora en aislamientos clínicos de S. aureus, confiere resistencia frente a fluoroquinolonas y antisépticos (27, 32).

Secuencias de inserción: En algunos aislamientos clínicos han sido identificadas secuencias de inserción (SI) localizadas cerca de genes que codifican componentes estructurales de bombas de eflujo o bien insertadas dentro de genes represores. Algunas SI tienen promotores o secuencias promotoras que incrementan la expresión de genes de bombas de eflujo cercanos. Una SI fue descripta insertada dentro del gen represor *mexR* que codifica la proteína represora transcripcional MexR en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* (27).

IMPACTO DEL EFLUJO EN LA RESISTENCIA

La resistencia intrínseca o natural de muchas bacterias a los antimicrobianos depende de la expresión inducible o constitutiva de los sistemas de eflujo activos. Como se mencionó previamente, las bombas de eflujo tienen la capacidad de expulsar aquellas sustancias que resultan nocivas para la supervivencia del microorganismo. Es por ello que actualmente está aceptado que la "resistencia intrínseca" de las bacterias gramnegativas a ciertos antimicrobianos comparada con las grampositivas es resultado de la presencia de dicho eflujo (6, 16).

En *E. coli,* por ejemplo, se han observado incrementos adicionales en la concentración inhibitoria mínima de los antibióticos luego de que ocurra la sobreexpresión de bombas de diferentes clases, resultando altamente resistente (6).

Por sí solos los sistemas de eflujo confieren de bajos a moderados niveles de resistencia (incrementos de la CIM de 1 a 64 veces). Razón por la cual su relevancia fue cuestionada. Sin

embargo, esa bacteria estará mejor equipada para sobrevivir bajo la presión de los antimicrobianos y desarrollar posteriores mutaciones en sus genes. En general estos sistemas de resistencia se presentan en cooperación con otros mecanismos para conferir, no solamente elevados niveles de resistencia, sino también un mayor espectro de acción (6, 16).

La barrera externa de membrana y el sistema de eflujo deben actuar sinérgicamente para lograr disminuir las concentraciones de los agentes antibacterianos a nivel del citoplasma y periplasma. Las bombas AcrAB de *E. coli* pueden producir resistencia intrínseca únicamente a agentes lipofílicos de largas cadenas que atraviesan con dificultad los eficientes canales porínicos, como es el caso de la eritromicina, el ácido fusídico, secantes y detergentes; pero el organismo permanece susceptible a antibióticos pequeños capaces de difundir rápidamente a través de dichos canales, como las tetraciclinas, cloranfenicol y fluoroquinolonas. Este eficiente sinergismo implica que los sistemas de eflujo por multicomponentes pueden producir niveles de resistencia significativos aún cuando la velocidad máxima (Vmax) de sus transportadores sea baja, siempre que su membrana externa funcione como una efectiva barrera (25).

Otro ejemplo típico de cooperación es entre el eflujo a las penicilinas y la acción de las enzimas β-lactamasas, El eflujo permite que el sistema enzimático no se sature. Estas bacterias muestran un fenotipo con altos niveles de resistencia a las penicilinas sin ser grandes productoras de β-lactamasas (18).

Así puede observarse en un trabajo realizado en *P. aeruginosa* donde la resistencia a penem aumenta como resultado de la acción simultánea de tres mecanismos de resistencia combinados: la barrera externa de membrana, el activo sistema de eflujo MexAB-OprM y la β-lactamasa AmpC (33, 34).

Otro ejemplo se observa con el estudio del rol de la β-lactamasa cromosómica AmpC y el sistema de eflujo AcrAB a nivel de la resistencia intrínseca y susceptibilidad en *E. coli*. La expresión de β-lactamasas clase C confiere resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación. Las bombas de eflujo, generan resistencia a penicilinas. El resultado global de la combinación de ambos mecanismos es que su susceptibilidad queda restringida solamente a cefalosporinas de tercera y de cuarta generación (35).

Para el caso de las fluoroquinolonas, la resistencia resulta de una mutación puntual a nivel de DNAgirasa/topoisomerasa IV. Una simple mutación en general, da lugar a bajos niveles de resistencia y la bacteria puede seguir siendo considerada como sensible. Para lograr niveles mayores debe pasar por dos o más mutaciones. Datos recientes han demostrado que la combinación de una mutación puntual más la presencia de bombas de eflujo para fluoroquinolonas, produce efecto sinérgico con altos niveles de resistencia (18).

Esto fue particularmente demostrado para levofloxacina en *P. aeruginosa* donde la disrupción de genes de tres tipos de bombas de la familia RND, no solamente logra una disminución de la CIM desde 0.25 a < 0.02 mg/L, sino que también disminuye la frecuencia de aparición de mutantes de 2×10^{-7} a $< 10^{-11}$. Cabe destacar que todas las bombas deberían ser inactivadas simultáneamente para obtener dicho resultado (36).

También se encuentran datos que indican que la expresión de varias bombas de eflujo de diferentes familias en una especie bacteriana determinada puede dar un aparente fenotipo de elevada resistencia cuando se consideran los sustratos compartidos (18).

En bacterias gramnegativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* se estudiaron los efectos de la expresión simultánea de sistemas de eflujo en variadas combinaciones: 1) expresión simultánea de bombas de eflujo con estructura simple, de un solo componente que exportan antimicrobianos al periplasma, en combinación con bombas de eflujo multicompuestas que completan la expulsión de los sustratos al medio externo; 2) combinación de dos bombas de eflujo de componente simple; y 3) expresión combinada de dos bombas complejas, multicompuestas. Como resultado se observó que en el primer caso, el nivel de resistencia expresado fue significativamente mayor en comparación con los otros dos.

La resistencia cruzada sucede cuando un organismo, al volverse resistente a un antibiótico, se transforma en resistente a otro diferente. La resistencia cruzada es común entre los macrólidos y las fluoroquinolonas. Este es un problema que surge con este tipo de mecanismo de resistencia por el amplio rango de sustratos que posee. La exposición a cualquier antimicrobiano o sustrato puede servir como inductor o regulador de la expresión de bombas de eflujo, favorecer a la sobreexpresión de esta, y producir, en consecuencia, resistencia cruzada con todos los otros sustratos posibles (6, 16).

Un ejemplo de resistencia cruzada ocurre en *Enterobacter aerogenes* donde el nivel de expresión del regulador MarA, involucrado en el control genético de la permeabilidad de membrana vía porinas y de la expresión de la bomba de eflujo AcrAB-TolC, es afectado por la presencia de imipenem. Por lo tanto, la exposición a estos carbapenemes, que no son sustratos de la bomba, está acompañada de una disminución de la susceptibilidad a quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol (34).

Otro caso citado en la bibliografía, es el de

pacientes hospitalizados infectados con *P. aeruginosa*, tratados únicamente con β-lactámicos antipseudomoniales que desarrollaron multirresistencia post tratamiento. En varios de los aislamientos estudiados, curiosamente existían niveles basales de β-lactamasa AmpC. Estos resultados indican que en el curso de la terapia ocurrieron mutaciones en genes reguladores (*mexR*) de la expresión de sistemas de eflujo tipo MDR con consecuente sobreexpresión de bombas de eflujo MexA-MexB-OprM. Como resultado final las cepas manifestaron resistencia no solamente a β-lactámicos sino también a fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprima (37).

La resistencia por bombas de eflujo puede ser fácilmente diseminada entre especies bacterianas filogenéticamente disímiles. Como ya fue mencionado, los elementos genéticos que codifican la expresión de las bombas pueden hallarse presentes en plásmidos (Tet grampositivas), o en transposones conjugativos o transformables localizados en dichos plásmidos (Tet gramnegativas) (16). Así como también en el DNA cromosómico (Acr de *E. coli* y Mex de *P. aeruginosa)* (6).

Sin embargo, es importante remarcar que la sobreexpresión ilimitada de sistemas de eflujo en la membrana bacteriana es potencialmente desventajosa para la bacteria, existe riesgo de expulsar no solamente sustancias nocivas en su accionar, sino también nutrientes esenciales para su crecimiento (16).

BOMBAS DE EFLUJO MDR Y PRINCIPALES SUSTRATOS EN CEPAS BACTERIANAS PATÓGENAS Y COMENSALES

El fenotipo MDR es aquel observado en cepas mutantes que sobreexpresan bombas de eflujo y que manifiestan resistencia (o menor susceptibilidad) frente a por lo menos tres clases diferentes de antimicrobianos, desinfectantes (biocidas), detergentes y/o colorantes. Este amplio espectro de sustratos generalmente incluye a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, bromuro de etidio, acriflavina, dodecil sulfato de sodio (SDS), Triton X-100, y triclosan; pero los agentes considerados sustratos de cada bomba en particular son levemente diferentes dependiendo de la bomba y de la especie bacteriana (27).

Cabe señalar que el valor de la CIM de cepas MDR que sobreexpresan bombas de eflujo es típicamente de dos a ocho veces mayor comparado con una cepa susceptible típica. Del mismo modo, si a una cepa mutante con sobreexpresión de bombas se le practica deleción de los genes involucrados en dicha expresión, la CIM decrece notablemente dando lugar a un fenotipo hipersusceptible (37).

Un cuestionamiento importante es para qué especies bacterianas las bombas de eflujo tipo MDR confieren resistencia con relevancia clínica, especialmente en referencia a antimicrobianos que se usen rutinariamente en medicina humana y veterinaria. Son muchas las bacterias que expresan sistemas de eflujo en su membrana, a continuación se mencionan algunos ejemplos de microorganismos de importancia:

BACTERIAS GRAMNEGATIVAS:

Pseudomonas aeruginosa: En este microorganismo además del conocido sistema de eflujo MexAB-OprM, se han caracterizado tres más: MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN. Tanto MexAB-OprM como MexXY-OprM, se expresan constitutivamente y confieren resistencia intrínseca con fenotipo MDR. Por el contrario, MexCD-OprJ y MexEF-OprN son inducibles por ciertos sustratos. Además de expulsar fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y algunos β-lactámicos, también pueden expulsar bromuro de etidio, acriflavina, triclosan, SDS, solventes orgánicos y otros. A pesar del incremento que ocurre en la CIM cuando se sobreexpresan estos sistemas, para algunos antimicrobianos como la ciprofloxacina, ese valor no supera la concentración de referencia recomendada por la CLSI. Recientemente se ha descripto también en *P. aeruginosa* un sistema de eflujo MATE, denominado PmpM. Este utiliza como sustrato a fluoroquinolonas, cloruro de benzalconio, bromuro de etidio, acriflavina y tetrafenilfosfonio clorado (38).

Cho y col (39) determinaron la frecuencia de resistencia mediada por bombas de eflujo en 409 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* fluoroquinolona-resistente obtenidos en 12 países, entre ellos Japón, Canadá, Grecia, Venezuela y Argentina. MexAB fue la bomba de eflujo detectada con mayor prevalencia (72%). Sin embargo, hubo importantes variaciones entre los perfiles hallados en cada región. Ese mismo fenotipo con bombas tipo MexA- MexB - OprM fue identificado en 11 aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes hospitalizados en un estudio realizado en Francia. Estos habían sido tratados con β-lactámicos antipseudomoniales y desarrollaron multirresistencia (37).

Escherichia coli: A pesar que este microorganismo es reconocido como comensal, es también causa frecuente de infecciones urinarias en humanos. *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica son importantes agentes responsables de ocasionar diarrea con elevada morbimortalidad entre individuos inmunocomprometidos y niños. En *E. coli* el sistema AcrAB-TolC de la familia RND es homóloga a MexAB-OprM de *P. aeruginosa* El perfil de sustratos de este sistema de eflujo esta representado por: cloranfenicol, β-lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, rifampicina,

novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico, bromuro de etidio, acriflavina, sales biliares, ácidos grasos de cadena corta, SDS, Triton-100 y triclosan. Los operones *acrD* y *acrEF* también codifican genes para la expresión de bombas de eflujo. AcrD provoca resistencia frente a aminoglucósidos (40).

Everet y col. (41) analizaron 36 aislamientos de *E. coli* provenientes de hombres y animales de Argentina, España y Gran Bretania que presentaban valores de CIM entre 2 y >128 µg/ml para ciprofloxacina. Se demostró la presencia de bombas de eflujo mediante el uso de un inhibidor de bombas en 22 de ellos.

Salmonella entérica: Otra área donde las cepas MDR juegan un rol importante es en la resistencia a los antimicrobianos de los patógenos transmitidos por alimentos. Como fue mencionado previamente es bien conocido el riesgo de transferencia de resistencia a los antimicrobianos entre el hombre y los animales, particularmente en relación a bacterias animales con capacidad zoonótica (*Campylobacter jejuni* y varios serovares de *Salmonella entérica*). El consumo de pollo en estos casos particulares es de relevante importancia como ruta de transmisión. *S. entérica* serovar Typhimurium, posee varias clases de bombas de eflujo. Entre estas, se encuentra AcrAB semejante a la descripta para *E. coli* y con igual rango de sustratos. Su expresión esta controlada por un regulador específico denominado RamA e inducida por la presencia de indol y bilis en el medio (42). Se ha demostrado un papel importante de la bomba de eflujo AcrAB-TolC en aislamientos MDR de *S. entérica* serovar Typhimurium DT104 provenientes de ganado bovino en Bélgica y Francia (42, 43).

Campylobacter spp.: En *C. jejuni* se ha demostrado que CmeABC media el eflujo y confiere a este organismo un fenotipo MDR. CmeA tiene gran semejanza con AcrA de *E. coli* y MexA de *P. aeruginosa*, mientras que CmeB es similar a AcrB y MexB de las mismas especies. CmeABC confiere resistencia frente a ciprofloxacina y eritromicina (ambos usados para el tratamiento terapéutico de este microorganismo), ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol. Produce también susceptibilidad reducida frente a triclosan, sales biliares, y Triton X-100. Un segundo sistema de eflujo descripto para esta especie bacteriana, CmeDEF no expresa resistencia frente a ciprofloxacina ni a eritromicina (44).

Pumbwe y col estudiaron la expresión de *cmeB, cmeF* y *porA* en 32 aislamientos de cepas MDR de *C. jejuni* obtenidas de muestras humanas y animales (pollos). La sobreexpresión de *cmeB,* hallada en un tercio de los aislamientos analizados, demostró su asociación con el fenotipo MDR (45).

Otros sistemas de eflujo homólogos a Acr y Mex de la familia RND han sido descriptos en otras bacterias gramnegativas como por ejemplo *Enterobacter aerogenes* (34), *Proteus mirabilis* (46).

BACTERIAS GRAMPOSITIVAS:

Bacillus subtilis posee un sistema de eflujo MDR que pertenece a la familia MFS, denominado Bmr. A pesar que existe escasa significancia clínica para esta bomba en medicina humana y veterinaria, ha sido demostrado que la bomba de eflujo NorA de *S. aureus* y PmrA de *S. pneumoniae* presentan significativa similitud con ella. Por lo cual, se han realizado numerosas analogías entre las propiedades de Bmr y las bombas mencionadas (27).

En *S. aureus,* por ejemplo, la sobreexpresión del sistema de eflujo NorA con fenotipo MDR posee como sustratos a fluoroquinolonas, cloranfenicol, antisépticos, tinturas y desinfectantes. Un dato de importancia es que NorA se encuentra presente tanto en *S. aureus* meticilino-sensibles (MSSA), así como en los meticilino resistentes (MRSA). Por otra parte, la sobreexpresión de NorB, otra bomba de eflujo descripta en este microorganismo, confiere únicamente susceptibilidad reducida frente a fluoroquinolonas, tetraciclinas, desinfectantes y tinturas (27).

ESTRATEGIAS PARA MODIFICAR LA RESISTENCIA BACTERIANA POR EFLUJO

Existe creciente evidencia sobre la importancia de las bombas de eflujo en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. A pesar de no generar elevados niveles de resistencia por sí solas, la sobreexpresión de las mismas en combinación y cooperación con otros mecanismos de resistencia adquiere significancia clínica. Razón por la cual se analizan diversas estrategias para modificar y revertir la resistencia bacteriana por eflujo:

Evasión de los mecanismos de bombas de eflujo: A pesar que no han sido totalmente elucidados los determinantes moleculares responsables del reconocimiento de antibióticos por bombas de eflujo, pueden observarse diferencias en el transporte de miembros estructuralmente análogos de una familia de antimicrobianos. Se han desarrollado nuevas moléculas que poseen menor susceptibilidad al eflujo si se las compara con las moléculas originarias de los principales grupos de antibióticos. Así se ha demostrado para las quinolonas de tercera y cuarta generación versus las de primera y segunda; cetólidos versus macrólidos o glicilciclinas versus tetracilinas (16).

Inhibición biológica de la actividad de eflujo: Otra estrategia para inhibir la actividad de las bombas, puede ser mediante bloqueo de las proteínas responsables del eflujo por medio del uso de anticuerpos neutralizantes; o bien, bloqueando los genes correspondientes responsables de la expresión de las mismas. La utilización de esta estrategia está basada en la demostración de que la deleción del gen *acrAB* en *E. coli* restaura la sensibilidad a los antibióticos, mientras que la mutación en el regulador genético Mar tiene el efecto contrario (47, 48).

Inhibición farmacológica del eflujo: La inducción de una competencia por la bomba de eflujo es probablemente el mecanismo de acción más razonable de los inhibidores de bomba. La reserpina es el inhibidor más popular, aunque también se han descripto otras drogas con similares efectos como fenotiazinas, antagonistas de calcio, inhibidores selectivos de serotonina o bien, inhibidores de las bombas de protones. La mayor limitación de combinar estas drogas con los antibióticos es que ellas necesitan ser utilizadas en concentraciones significativamente elevadas como inhibidores en comparación con la concentración usada para ejercer sus efectos farmacológicos más conocidos; lo cual las hace no viables por razones de seguridad (22).

Una primera categoría de inhibidores originales son las moléculas antibióticas análogas a los antibióticos de uso clínico, pero con menor efecto antibacteriano. Tres familias han sido patentadas, análogas de tetraciclinas, aminoglucósidos y quinolonas, las cuales logran disminuir el eflujo de los antibióticos respectivos (22).

Una segunda categoría la conforman los inhibidores no relacionados estructuralmente a antibióticos conocidos, es decir, totalmente nuevos. Algunos de ellos logran inhibir bombas que efluyen múltiples clases de antibióticos (22).

Basándose en observaciones empíricas de las propiedades de estos inhibidores puede concluirse que la estructura química de varios de ellos, tiene características recurrentes como por ejemplo: *anillos aromáticos* presentes en todas las moléculas (con excepción de análogos de los aminoglucósidos) y *grupos ionizables* encontrados en muchos de ellos. Esto es consistente con el hecho de que las bombas de eflujo transportan preferentemente sustancias anfifílicas como sustrato y poseen afinidad de unión a grupos con cadenas aminoacídicas de superficie, propensas a establecer uniones hidrofóbicas, uniones aromáticas e interacciones van der Waals (22).

Algunos de los inhibidores también pueden modular transportadores de células eucariotas como P-glicoproteína, MRP o BCRP, como se demostró con el verapamilo, VX-710, VX-853 y GF120918. Por otra parte, otros inhibidores como MC207 o el MC110 no interactúan con los transportadores de las células eucariotas, sino que son específicos de las bombas procariotas. Esto favorece la especificidad de acción y minimiza efectos indeseables que involucran inhibición de funciones fisiológicas (22).

LA MULTIRRESISTENCIA Y LA ACTUALIDAD

El impacto clínico de la multirresistencia por bombas de eflujo es difícil de establecer debido a que no contamos con estadística internacional ni nacional a gran escala, que permita comparar la prevalencia de este mecanismo de resistencia con otros. Existen numerosas publicaciones referentes a la descripción de las bombas y los sistemas de eflujo en los diferentes microorganismos pero muy poco referente a su importancia en la clínica.

Varios autores (22, 49, 50, 51, 52, 53, 54) evalúan la aplicación de inhibidores de bomba como posibles alternativas para revertir o reducir la resistencia a los antimicrobianos involucrados.

En cuanto a microoganismos patógenos, en diferentes lugares del mundo se han publicado diversos trabajos sobre multirresistencia ocasionada por bombas de eflujo, en su mayoría pertenecientes a la familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*). En muchos de ellos, se evalúa la importancia de la utilización de inhibidores de bombas de eflujo como herramienta para bloquear la sobreexpresión de estos sistemas de eflujo (responsables de dar origen a cepas MDR), así como la prevalencia de la resistencia de tales microorganismos en aislamientos de origen animal y del hombre. Entre los microorganismos más estudiados pueden mencionarse *Campylobacter* (31, 44, 51), *Pseudomonas* (36, 52), *Enterobacter* (50), *Klebsiella* (55) y *Salmonella* (56).

Por otra parte, en cuanto a las cepas comensales, es sabido que el intestino es el principal sitio de transferencia de la antibióticorresistencia. *E. coli* es una de las bacterias comensales con mayores posibilidades de generar resistencias en el campo humano y veterinario. Uno de los mecanismos de multirresistencia de *E. coli* a antibióticos lipofílicos/anfifílicos, como mencionamos en párrafos anteriores está representado por la sobreexpresión de bombas de eflujo (25, 57). Su monitoreo permite conocer que antimicrobianos están generando resistencia, evitar riesgos en salud pública, disminuir el fracaso terapéutico y por lo tanto evitar pérdidas económicas al productor (58, 59). Por esta razón se están realizando diversos estudios donde se evalúa el efecto de los inhibidores de bombas sobre esta cepa comensal. La mayoría de ellos se realiza en aislamientos de origen humano o mutantes experimentales (49, 53, 54, 60).

En diversos países ya se han puesto en marcha numerosos programas de monitoreo de la resistencia en animales y en el hombre orientados principalmente a la vigilancia de la resistencia en patógenos humanos, microorganismos zoonóticos y bacterias indicadoras de la microbiota intestinal normal de los animales.

CONCLUSIONES

La resistencia a múltiples fármacos es un fenómeno que amenaza la salud pública. Los sistemas de eflujo como mecanismo de resistencia a múltiples drogas pueden transformarse en un prometedor blanco farmacológico para restaurar la actividad de los antimicrobianos que resulten sustrato de ese sistema. Sin embargo, existe aún escasa información tanto a nivel nacional como internacional acerca de la prevalencia de la sobreexpresión de bombas de eflujo en aislamientos clínicos de hombres y/o animales y su vinculación con la incidencia en el fracaso terapéutico por multirresistencia.

La sospecha de la presencia de bombas de eflujo como mecanismo de resistencia debería ser confirmada fenotípica y genotípicamente como una herramienta de rutina, con el propósito de anticiparnos a la aparición de resistencia cruzada. Lamentablemente aún no existe una técnica específica que permita la identificación fenotípica temprana, por lo cual todos los estudios encaminados a esclarecer está problemática serán bien recibidos.

Por otra parte, en la actualidad, la investigación se focaliza también en desarrollar nuevas alterativas terapéuticas. Tales como el descubrimiento de nuevos antimicrobianos que no sean sustrato de las bombas o desarrollar nuevos sinergismos con sustancias que en asociación con los antimicrobianos provoquen bloqueo de los transportadores facilitando y mejorando la acción de los últimos.

Finalmente, debemos remarcar, que el esclarecimiento de los mecanismos de multirresistencia, el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y la implementación de alternativas terapéuticas sin el manejo prudente de los antimicrobianos, solo ayudará a generar conocimiento pero no a controlar y minimizar la emergencia y diseminación de resistencia. Es de importancia fundamental no perder de vista la estrategia más eficaz contra la resistencia a los antimicrobianos: *el uso racional*. El uso racional de los antimicrobianos tiene como objetivo fundamentalmente limitar el desarrollo de microorganismos resistentes para obtener el mayor beneficio para el enfermo.

Partiendo de una buena utilización de los antimicrobianos y de la mano de las nuevas herramientas terapéuticas las bacterias empezaran a estar en desventaja en la interminable guerra contra la multirresistencia.

BIBLIOGRAFIA

1. Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. J Dairy Sci 1994; 264: 375-82.

2. Miller P, Rather P. Global response systems that cause resistance. En Lewis R, Sayers A, Taber H, Wax R, editors. Bacterial resistance to antimicrobials. New York, Basel, 2002, p. 60-82.

3. European Agency for Evaluation of Medicinal Products. Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines, 1999, EMEA/CVMP/342/99, London, UK.

4. Levy S. Emergence of antibiotic-resistance bacteria in the intestinal flora of farm inhabitants. J Infect Dis 1978, 137: 689-90.

5. Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencias del desarrollo de resistencias en salud pública, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación FAO. Roma, Italia, 2004.

6. Webber M, Piddock L. The importante of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. J Antimicrob Chemother 2003, 51: 9-11.

7. Livermore D. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microbiol Rev 1995; 8: 557–84.

8. Mingeot-Leclercq M, Glupczynski Y, Tulkens P. Aminoglycosides: activity and resistance. Minireview. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 727–37.

9. Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 2003; 51: 1109-17.

10. Spratt R. Resistance to antibiotic mediated by target alterations. Science 1994, 264: 388-93.

11. Delcour A. Outer membrana permeability and antibiotic resistance. Biochim Biophys Acta 2009; 1794: 808–16.

12. Scatamburlo Moreira M, Chartone de Souza E, Alencar de Morais C. Multidrug efflux systems in gram – negative bacteria. Braz J Med Biol Res 2004; 35: 19-28.

13. Thanassi D, Cheng L, Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. J Bacteriol 1997; 179: 2512-18.

14. Lynch A. Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. Biochem Pharmacol 2006; 71: 949-56.

15. Saier M, Paulsen I, Sliwinski M, Pao S, Skuffay R, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. FACEB J 1998; 12: 265-74.

16. Van Bambeke F, Glupzynski Y, Plesiat P. Antibiotic efflux pumps in procaryotic cells: occurence, impact for resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. J Antimicrob Chemother 2003; 51:1167-73.

17. Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants. J Bacteriol 1996; 178:306-08.

18. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens P. Antimicrobial efflux pumps. Biochem Pharmacol 2000; 60: 457-70.

19. Igarashi Y, Aoki K, Mamitsuka H, Kuma K, Kanehisa M. The evolutionary repertoires of the Eukaryotic-Type ABC transporters in terms of the phylogeny of ATP-binding domains in eukaryotes and prokaryotes. Mol Biol Evol 2004; 21: 2149-60.

20. Shilling R, Balakrishnan L, Shahi S, Venter H, van Veen H. A new dimer interface for an ABC transporter. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 200-4.

21. Paulsen I, Brown M, Skurray R. Proton-dependent multidrug efflux systems. FEMS Microbiol Rev 1996; 60: 575-608.

22. Van Bambeke F, Pages J, Lee V. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. Recent Pat Antiinfect Drug Discov 2006, 1: 157-75.

23. Aeschlimann J. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. Pharmacotherapy 2003; 23: 916–24.

24. Mesaros N, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R, Tulkens P. L'Efflux des antibiotiques: Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question el implications microbiologiques et cliniques. Louvain Medical 2005; 124, 8: 308-20.

25. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gramnegative bacteria. J Bacteriol 1996; 178: 5853-59.

26. Pos K. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. Biochim Biophys Acta 2009; 1794: 782-93.

27. Piddock L. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 382-402.

28. Olliver A, Valle M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. FEMS Microbiol Lett 2004; 238: 267-72.

29. Pradel E, Pagès J. The AcrAB-TolC pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 2640-43.

30. Putman M, van Veen H, Konings W. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. Microbiol Mol Biol Rev 2000; 64: 672- 93.

31. Randall L, Ridley A, Cooles S, Sharma M, Sayers A, Pumbwe L et al. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. J Antimicrob Chemother 2003; 52: 507–10.

32. Noguchi N, Okada H, Narui K, Sasatsu M. Comparison of the nucleotide sequence and expression of *norA* genes and microbial susceptibility in 21 strains of *Staphylococcus aureus*. Microbial Drug Resistance 2004; 10: 197–203.

33. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1964–71.

34. Bornet C, Davin-Régli A, Bosi C, Pagès J, Bollet C. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. J Clin Microbiol 2000; 38: 1048-52.

35. Mazzariol A, Cornaglia G, Nikaido H. Contributions of the AmpC β-lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of E*scherichia coli* k-12 to β-lactams. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 1387–90.

36. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren M et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 1340–46.

37. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 287-91.

38. Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 565-70.

39. Cho D, Blais J, Tangen K, Ford C, Lee A, Lomovskaya O et al. Prevalence of efflux pump overexpression among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, Abstract 1267, p 327, San Francisco, CA.

40. Elkins C, Nikaido H. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. J Bacteriol 2002; 184: 6490–98.

41. Everett M, Jin Y, Ricci V, Piddock L. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* isolates from humans and animals. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2380-86.

42. Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. J Biol Chem 2008; 283: 24245–53.

43. Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3729-35.

44. Lin J, Martinez A. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. J Antimicrob Chemother 2006; 58: 966–72.

45. Pumbwe L, Randall L, Woodward M, Piddock L. Expression of the efflux pump genes *cmeB, cmeF* and the porin gene *porA* in multiply antibiotic-resistant *Campylobacter* spp. J Antimicrob Chemother 2004; 54: 341-47.

46. Visalli M, Murphy E, Projan S, Bradford P. AcrAB

multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in. *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 665-9.

47. Kern W, Oethinger M, Jellen-Ritter A. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 10-13.

48. Oethinger M, Kern W, Jellen-Ritter A. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 814-20.

49. Bohnert J, Kern W. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 849–52.

50. Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1043-46.

51. Hannula M, Hänninen M. Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Med Microbiol 2008; 57: 851–55.

52. Hendricks O, Butterworth T, Kristiansen J. The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 262-64.

53. Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C, Vila J. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg-β-naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 544-45.

54. Schumacher A, Steinke P, Bohnert J, Akova M, Jonas D, Kern W. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 344–48.

55. Hasdemir U, Chevalier J, Nordmann P. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. J Clin Microbiol 2004; 42: 2701-06.

56. Thorrold C, Letsoalo M, Dusé A, Marais E. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant Salmonella and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. Int J Food Microbiol 2007; 113: 315–20.

57. Sáenz Y, Briñas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3996-4001.

58. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GL. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. Rev Argent Microbiol 2010; 42: 49-52.

59. Suk-Kyung L, Hee-Soo L, Hyang-Mi N, Yun-Sang C, Jong-Man K, Si-Wook S, et al. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004. Int J Food Microbiol 2007; 116: 283–86.

60. Elkins C, Mullis L. Substrate competition studies using whole-cell accumulation assays with the major tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 923–29.