

Antimicrobians
(Joaquim Ruiz, ed.)

Treballs de la SCB. Vol. 55 (2004) 49-60

SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA I LLUR RELACIÓ AMB LA RESISTÈNCIA ALS AGENTS ANTIBACTERIANS

JORDI VILA, JAVIER SÁNCHEZ-CÉSPEDES I ANNA RIBERA

*Servei de Microbiologia, Centre de Diagnòstic Biomèdic, Hospital Clínic,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.*

Adreça per a la correspondència: Jordi Vila. Servei de Microbiologia, Hospital Clínic,
Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. Villarroel, 170. 08036 Barcelona.
Adreça electrònica: jvila@ub.edu.

RESUM

Els microorganismes han desenvolupat diversos mecanismes per resistir els efectes tòxics dels agents antibacterians. Entre aquests es troba la disminució de l'acumulació de l'agent antibacterià a l'interior del bacteri, la qual cosa pot ésser deguda a la disminució de la permeabilitat de la membrana externa en els bacteris gramnegatius i a la sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa en ambdós tipus de bacteris, gramnegatius i positius. En bacteris gramnegatius la interacció entre aquests dos mecanismes és el que probablement es dona amb més freqüència. Els sistemes d'expulsió activa s'han dividit en diferents famílies segons llur arquitectura molecular, mecanisme d'acció, requeriments energètics i especificitat de substrat. Aquests sistemes d'expulsió activa s'han de considerar com a potencials dianes terapèutiques, ja que llur inhibició restauraria l'activitat antibacteriana. Així doncs, una possible nova estratègia terapèutica seria el desenvolupament d'inhibidors d'aquests sistemes d'expulsió activa, que serien administrats conjuntament amb l'agent antibacterià que es veuria afectat pel sistema d'expulsió.

Paraules clau: bombes d'expulsió, resistència, agents antibacterians.

SUMMARY

Microorganisms have developed several mechanisms to resist toxic effects from antibacterial agents; among them we found decrease in drug accumulation, which can be due to a decrease of permeability in Gram-negative bacteria or/and to an increased expression of one or more efflux pumps in both Gram-negative and Gram-positive bacteria. Among Gram-negative bacteria the interplay between both mechanisms is frequently found. Active efflux systems can be distributed in several families, depending on their molecular architecture, mechanism of action, energetic requirements and substrate specificity. Those active efflux systems have been considered as potential therapeutic targets, since their inhibition can restore antibacterial agent

activity. Therefore, a possible new therapeutic strategy would be found in development of efflux pumps inhibitors, which would be administered together with the antibacterial agent.

Keywords: Efflux pumps, resistance, antibacterial agents.

INTRODUCCIÓ

La coberta celular bacteriana proporciona al bacteri la forma i rigidesa necessàries per resistir la pressió osmòtica generada per l'elevada concentració intracel·lular de ions, metabòlits i macromolècules. A més, constitueix una barrera enfront de certes substàncies tòxiques i biològiques. A les figures 1a i 1b s'observa l'estructura de la coberta celular d'un bacteri grampositiu i d'un gramnegatiu. En un bacteri grampositiu la coberta celular està constituïda fonamentalment pel peptidoglicà, mentre que la coberta d'un bacteri gramnegatiu es caracteritza per la presència d'una membrana externa i un espai periplasmàtic, que es troba delimitat per la membrana citoplasmàtica i la membrana externa. El peptidoglicà està immers en aquest espai. La membrana externa és una bicapa lipídica molt asimètrica. A la monocapa externa hi ha proteïnes i lipopolisacàrid, mentre que a la monocapa interna el lipopolisacàrid és substituït per fosfolípids i lipoproteïnes. El resultat és una membrana amb una fluïdesa menor que la membrana citoplasmàtica. Entre altres components de la membrana externa dels bacteris gramnegatius destaquen unes proteïnes anomenades *porines*. Es tracta de trímers que generen canals que permeten el pas de substàncies, regulades per un complex mecanisme genètic que respon a la concentració de soluts al medi. En bacteris grampositius, a part del peptidoglicà un altre component de la coberta celular és l'àcid teicoïc, que és un polímer de glicerol fosfat o ribitol fosfat amb diversos sucres o aminoàcids com a substituents. Aquest sembla estar unit al peptidoglicà o bé a un glicolípid de la membrana citoplasmàtica.

Finalment, la membrana citoplasmàtica dels bacteris és molt semblant a la típica bicapa li-

pídica d'altres cèl·lules. No obstant això, hi ha diferències importants: per exemple, la membrana citoplasmàtica bacteriana és excepcionalment rica en proteïnes, el cromosoma bacterià s'hi troba unit, i desenvolupa un paper important en la segregació de cromosomes naixents durant la divisió cel·lular. Conté, també, el sistema complet de transport d'electrons de la cèl·lula i proteïnes involucrades en el transport actiu i selectiu de soluts i en l'excreció de proteïnes i altres compostos a l'exterior.

QUÈ ÉS UN SISTEMA D'EXPULSIÓ ACTIVA?

Els microorganismes han desenvolupat diversos mecanismes per resistir els efectes tòxics dels antimicrobians (vegeu la figura 2), entre els quals es troba la disminució de l'acumulació de l'antibiòtic a l'interior bacterià, la qual cosa pot ésser deguda a diferents factors, tals com una disminució en la permeabilitat de la membrana externa a l'agent antibacterià en el cas dels bacteris gramnegatius i la sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa en ambdós tipus de bacteris, gramnegatius i positius. No obstant això, sembla que per si sola la disminució de la permeabilitat no és suficient perquè l'agent antibacterià no assoleixi l'acumulació a l'interior del bacteri, sinó que només hi ha un retard en l'entrada d'aquest (Nikaido, 1994). Avui dia, la funció natural d'aquests sistemes d'expulsió activa encara és una incògnita, i entre altres hipòtesis s'ha especulat que podrien estar implicats en mecanismes de destoxicació i que l'expulsió de fàrmacs seria un efecte col·lateral. Hom coneix que aquests sistemes eviten sobretot l'acció d'aquells antimicrobians que actuen al cito-

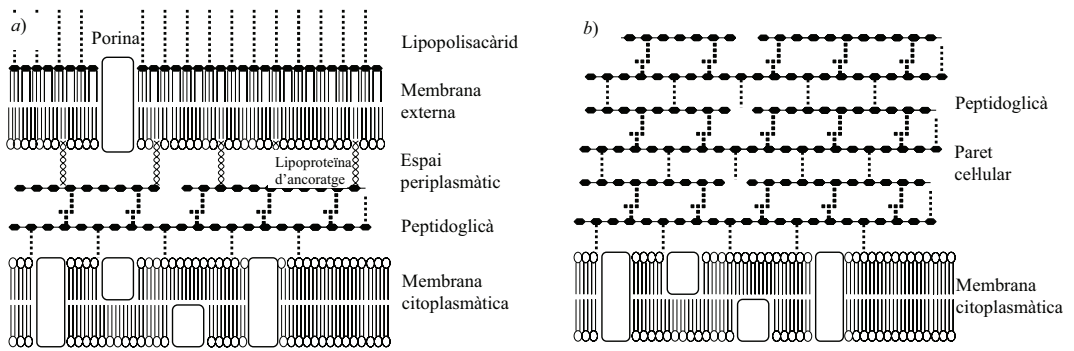


FIGURA 1. a) Coberta cel·lular d'un bacteri gramnegatiu. b) Envoltat cel·lular d'un bacteri grampositiu.

plasma bacterià, i ho fan expulsant l'antibiòtic fora de la cèl·lula abans que aquest pugui exercir la seva funció. El 1978 va sorgir una primera hipòtesi de l'existència d'aquests mecanismes amb la descripció de proteïnes de transport en bacteris gramnegatius als quals s'unien els antimicrobians (proteïnes descrites en *E. coli* capaces d'expulsar tetraciclina fora del citoplasma cel·lular). Des d'aquest descobriment el paper dels sistemes d'expulsió com a mecanisme de resistència als diversos antimicrobians ha estat explorat i caracteritzat, i s'ha arribat a la conclusió que aquests sistemes són comuns a la majoria de bacteris patògens i que són responsables de l'expulsió d'antibiòtics i altres toxines fora de les cèl·lules bacterianes, i asseguren així llur supervivència (Nelson, 2002). Mentre les propietats moleculars d'aquestes proteïnes d'expulsió i llur especificitat de substrat estan tot just començant a comprendre's en la majoria de gèneres bacterians, incloent-hi *E. coli* i *P. aeruginosa*, podem assumir raonablement que la majoria d'antimicrobians i xenobiòtics poden veure's afectats per aquests sistemes, i això els comporta certa inutilitat per al tractament de malalties infeccioses.

Alternativament, podem considerar aquestes bombes d'expulsió com atractives dianes terapèutiques, ja que llur inhibició restauraria l'activitat antibacteriana als substrats expulsats.

En general, el sistema d'expulsió activa en bacteris grampositius consta d'una única proteïna situada a la membrana citoplasmàtica que es troba acoblada al potencial de membrana o obtenint l'energia mitjançant la hidròlisi de l'ATP. En bacteris gramnegatius la majoria de sistemes d'expulsió activa que afecten agents antibacterians estan acoblats al potencial de membrana i estan constituïts per tres proteïnes, tot i que hi ha excepcions, com hom veurà a la següent secció. Aquestes tres proteïnes són: una proteïna transportadora integrada a la membrana citoplasmàtica, una porina situada a la membrana externa i una altra proteïna que actua com a nexa d'unió entre les altres dues i que es troba situada a l'espai periplasmàtic.

TIPUS DE SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA I LLUR RELACIÓ AMB LA RESISTÈNCIA A DIVERSOS AGENTS ANTIMICROBIANS

Les proteïnes d'expulsió activa han estat subdividides en diferents famílies, segons llur arquitectura molecular, els mecanismes d'acció, els requeriments energètics i la constitució bioquímica. Aquestes proteïnes es troben en quasi tots els microorganismes i llur paper com a mecanisme de resistència a antimicrobians està tot just essent elucidat. Així, per

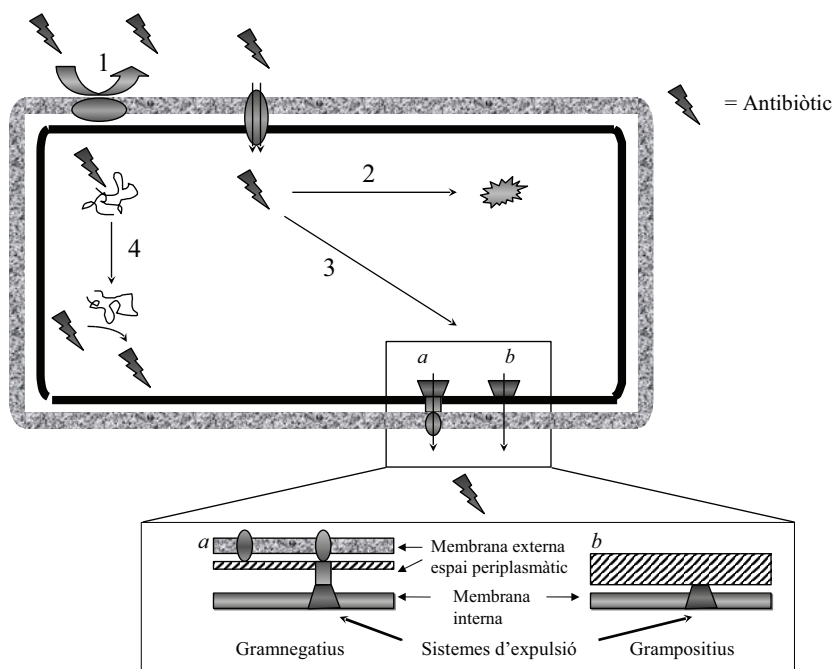


FIGURA 2. 1) Impermeabilitat de membrana. 2) Hidròlisi de l'antibiòtic. 3) Sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa. 4) Canvi conformacional a la proteïna diana.

exemple, s'espera que bacteris potencialment patògens puguin contenir combinacions de proteïnes d'expulsió pertanyents a les diferents famílies. Existeixen diferents tipus de bombes d'expulsió (Putman *et al.*, 2000) (vegeu la figura 3):

a) Bombes que són específiques de substrat i, per tant, confereixen resistència a un únic agent antimicrobià (p. ex.: les bombes que expulsen tetraciclina, que pertanyen a la família MFS). Normalment aquestes es troben codificades per gens que viatgen en transposons integrats en plasmidis conjugatius (Lomovskaya i Watkins, 2001).

b) Bombes inespecífiques de substrat i que, per tant, s'anomenen *transportadors de múltiples agents antimicrobians* (MDR, de l'anglès *multi-drug resistance*), poden conferir resistència a diferents components antibacterians no relacionats estructuralment. Normalment es troben codificades per gens que

formen part del cromosoma bacterià (Lomovskaya i Watkins, 2001).

A més, segons els criteris estructurals i bioenergètics aquests sistemes es divideixen en dos grups majoritaris (Putman *et al.*, 2000):

a) Transportadors de múltiples antimicrobians del tipus ABC, els quals utilitzen l'energia que prové de la hidròlisi de l'ATP per expulsar els antimicrobians fora de la cèl·lula.

b) Transportadors secundaris de múltiples antimicrobians, els quals expulsen l'antibiòtic fora de la cèl·lula a través d'un intercanvi de protons o de ions sodi. De bombes d'aquests tipus tenim les de la família RND, SMR, MFS i MATE (aquesta subdivisió està feta segons la mida que presentin i segons llur estructura primària i secundària).

Així, tenim diferents famílies relacionades amb l'expulsió activa i aquestes es divideixen en (Putman *et al.*, 2000; Borges-Walmsley i Walmsley, 2001; Nelson, 2002):

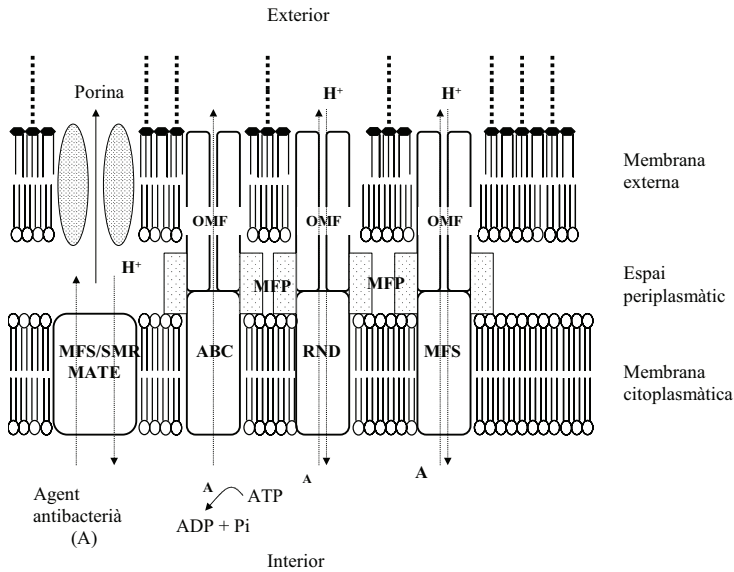


FIGURA 3. Classes de sistemes d'expulsió activa.

a) MFS (de l'anglès *major facilitator superfamily*): aquesta família de transportadors està formada per proteïnes que presenten dotze o catorze segments transmembranosos (a la membrana citoplasmàtica) i utilitzen el flux de protons com a font d'energia. Aquest tipus de transportadors són presents tant en bacteris grampositius com gramnegatius i també en cèl·lules eucariotes. En els bacteris gramnegatius aquests sistemes es poden associar a una proteïna de fusió de membrana (MFP, de l'anglès *membrane fusion protein*) i a una proteïna de membrana externa (OMP, de l'anglès *outer membrane protein*), que forma un canal, per tal de translocar els antimicrobians a través de la membrana interna i externa, i els expulsa fora de la cèl·lula. Cal esmentar, però, que el veritable paper de les MFP és encara desconegut, encara que podrien actuar com una proteïna de canal capaç de translocar els agents antimicrobians entre el transportador de membrana interna i la proteïna de membrana externa. Una altra hipòtesi alternativa seria que les MFP empenyen les dues proteïnes a la vegada, de manera que el transpor-

tador de membrana interna passaria directament l'antibacterià a la proteïna de membrana externa (Borges-Walmsley i Walmsley, 2001). Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment agents antimicrobians, colorants d'amoni quaternari i ions fòsfor. I els bacteris hoste són principalment (entre parèntesi trobem alguns dels transportadors d'aquesta família descrits en el gènere bacterià): *Mycobacterium* (Tet V, Tap, LfrA), *Lactobacillus* (LmrP), *Staphylococcus* (Tet K, NorA, Qac A i B), *Bacillus* (Blt, Bmr i Bmr 3), *Escherichia* (Tet A, B i E, Bcr, Emr B i D, MdfA), *Streptococcus* (PmrA), *Vibrio* (VceB) i *Corynebacterium* (Cmr).

b) RND (de l'anglès *resistance-nodulation cell division family*). L'estructura d'aquests transportadors és més llarga que els que formen part de la família MFS, però només presenten dotze segments transmembranosos (encara que posseeixen uns dominis periplasmàtics i extracitoplasmàtics entre les hèlixs 1-2, 7 i 8 molt més llargs). Aquests transportadors, tal com els transportadors del tipus MFS, també es troben associats a les MFP i a les

proteïnes de membrana externa i utilitzen el flux de protons com a font d'energia. Aquest tipus de transportadors només s'ha descrit en bacteris gramnegatius; no s'han trobat en bacteris grampositius ni en cèl·lules eucariotes. Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment agents antimicrobians, àcids grassos, detergents i colorants bàsics. I els bacteris hoste són principalment: *Escherichia* (AcrB, AcrF, YhiV), *Pseudomonas* (MexB, MexD, MexF, MexY), *Neisseria* (MtrD), *Haemophilus* (HI0895 ≈ AcrB), *Burkholderia* (Ceo B, AmrB), *Stenotrophomonas* (SmeB i SmeE) i *Acinetobacter* (AdeB).

c) SMR (de l'anglès *small multidrug resistance family*). En aquesta família els transportadors són molt més petits que els de les famílies MFS i RND, ja que normalment estan formats per quatre fragments transmembranosos. També utilitzen el flux de protons com a font d'energia. Només presenten el transportador a la membrana citoplasmàtica, no es troben associats a cap MFP. S'han descrit tant en bacteris grampositius com gramnegatius, però no en cèl·lules eucariotes. Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment agents antimicrobians, antisèptics d'amoni quaternari, etidis i tetrafenilfosfats. I els bacteris hoste són principalment: *Mycobacterium* (Mmr), *Staphylococcus* (Qac G, H i Smr), *Bacillus* (EbrA i B, YkkC i D) i *Escherichia* (EmrE, TehA).

d) MATE (de l'anglès *multidrug and toxic compound extrusion family*). En aquesta família els transportadors estan formats per dotze segments transmembranosos i utilitzen el flux de protons com a font d'energia. S'han trobat tant en bacteris grampositius com gramnegatius. Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment colorants, fluoroquinolones hidrofíliques i aminoglicòsids. I els bacteris hoste són principalment: *Haemophilus*, *Vibrio* (NorM), *Bacillus* (PmrA) i *Escherichia* (Ydhe).

e) Transportadors del tipus ABC (de l'anglès *ATP-binding cassette*). Aquests són trans-

portadors que utilitzen com a font d'energia ATP i presenten múltiples segments transmembranosos. Es troben tant en cèl·lules eucariotes com procariotes (tant en bacteris grampositius com gramnegatius). Tenim com a membres: MDR1 humana, que és una P-glicoproteïna de resistència a múltiples antibiòtics, i els transportadors de resistència múltiple en humans associats a la proteïna MRP1 (MRP). Els principals substrats químics d'aquest tipus de bombes són principalment ionòfors, alcaloides d'etidi i fosfolípids. I els bacteris hoste són principalment: *Mycobacterium*, *Staphylococcus* (MsrA), *Lactobacillus* (LmrA) i *Escherichia* (MsbA, MdlA, MdlB, CydC, CydD).

f) PET (de l'anglès *putative efflux transporter family*). Aquests transportadors han estat trobats recentment en bacteris i en cèl·lules eucariotes, però llur paper en la resistència a agents antimicrobians no ha estat encara establert.

REGULACIÓ DEL SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA

La majoria d'aquests sistemes d'expulsió activa, a més d'estar sotmesos a una regulació local (repressora o activadora) per proteïnes codificades en gens adjacents als del mateix sistema, poden tenir l'expressió controlada a altres nivells. Seria lògic pensar que s'activen en presència de llur substrat natural; no obstant això, hom desconeix la funció real de la majoria d'aquests sistemes d'expulsió i, tot i que hom ha vist que són capaços d'expulsar una àmplia varietat de compostos, fins ara no s'han identificat els substrats naturals en la majoria del casos. Podríem dir que existeixen quatre sistemes de regulació:

a) *Regulació mitjançant un repressor local*. El gen que codifica la proteïna que actua com a repressor està localitzat cap amunt del primer gen de l'operó. En algunes ocasions la repressió no és total, sinó que permet una ex-

pressió basal que pot estar relacionada amb la resistència intrínseca basal a alguns agents antibacterians. Entre els diferents operons que codifiquen sistemes d'expulsió activa que es troben regulats per un repressor local trobem els sistemes AcrAB en *E. coli* (Ma *et al.*, 1996) i MexAB-OprM en *P. aeruginosa* (Evans *et al.*, 2001) (vegeu la figura 4). Generalment, l'aparició de fenotipus de multiresistència està associada a la presència de mutacions als gens reguladors locals o en llurs regions promotores (Jellenritter i Kern, 2001; Ziha-Zarifi *et al.*, 1999; Adewoye *et al.*, 2002).

b) *Regulació mitjançant un activador local.* Fins avui només s'ha identificat aquest tipus de regulació a l'operó mexEF-oprN de *P. aeruginosa*. L'activador local (*mexT*) està localitzat cap amunt dels gens de l'operó (Köhler *et al.*, 1999) (vegeu la figura 4).

c) *Activació mitjançant un sistema de doble component.* En general, aquests sistemes de doble component que vehiculen la transducció de senyals estan constituïts per una fosforilasa que rep els estímuls activadors i un regulador de la resposta que s'activa mitjançant fosforilació. Un d'aquests sistemes de doble component descrits en la bibliografia científica és l'EvgSA. EvgA és la proteïna reguladora de la resposta i activa els sistemes d'expulsió activa EmrKY i YhiUV en *E. coli* (Nishino i Yamaguchi, 2002). L'operó emrKY es localitza cap avall de l'operó regulador evgSA, mentre que, en el cas de l'operó yhiUV, l'activació s'exerceix a distància (vegeu la figura 4).

d) *Reguladors globals.* Grkovic *et al.* (2001) han indicat que la majoria de sistemes suara esmentats podrien estar regulats globalment. Aquests reguladors globals s'activen en situacions d'estrès bacterià (estrès oxidatiu, estrès osmòtic, xoc tèrmic, etc.) i regulen positivament i negativament l'expressió d'un ampli nombre de gens, entre els quals n'hi ha alguns que codifiquen sistemes d'expulsió activa. En *E. coli* l'activador global MarA (codificat pel gen *marA*) regula l'expressió tant positiva com negativa d'almenys seixanta gens (Barbosa i

Levy, 2000) (vegeu la figura 4). Entre aquests gens es troba l'operó *acrAB*. A més de MarA, s'han identificat tres reguladors globals en *E. coli* implicats en l'activació d'*acrAB*. Aquests són SoxS, Rob (Ma *et al.*, 1996) i SdiA (Rahmati *et al.*, 2002)

IMPORTÀNCIA CLÍNICA DE LA SOBREEXPRESSIÓ DE SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA

Com ha estat esmentat anteriorment, aquests sistemes d'expulsió activa es troben normalment reprimits, però sota certes condicions d'estrès microbià llur síntesi pot activar-se i generar fenotipus de resistència a agents antibacterians no detectats mitjançant tècniques habituals d'anàlisi al laboratori. Tenint en compte la infinitat de factors d'estrès que s'esdevenen al lloc de la infecció, aquests podrien contribuir a explicar la raó d'algun dels fracassos terapèutics per als quals no tenim actualment explicació. A més, durant la infecció es poden seleccionar mutants amb expressió constitutiva d'aquests sistemes d'expulsió, normalment per mutacions en llurs sistemes de regulació. Aquest fenomen es veu afavorit per dos factors, que són: a) si el bacteri presenta un fenotipus hipermutador, aquest afavoreix l'adquisició de mutacions que poden facilitar la pèrdua de la regulació dels sistemes d'expulsió activa i b) en aquells bacteris amb capacitat de produir *biofilm* hom ha descrit que pot tenir lloc un increment de sistemes d'expulsió activa.

Si bé els primers sistemes d'expulsió activa associats a resistència als agents antibacterians van ésser descrits en bacteris gramnegatius, com *E. coli* i *P. aeruginosa*, s'han reportat sistemes similars en la majoria de bacteris d'interès clínic, tant gramnegatius com grampositius. Fins avui, hom ha descrit cinc tipus diferents de sistemes d'expulsió activa en *P. aeruginosa* que poden afectar diversos agents antibacterians. A causa que

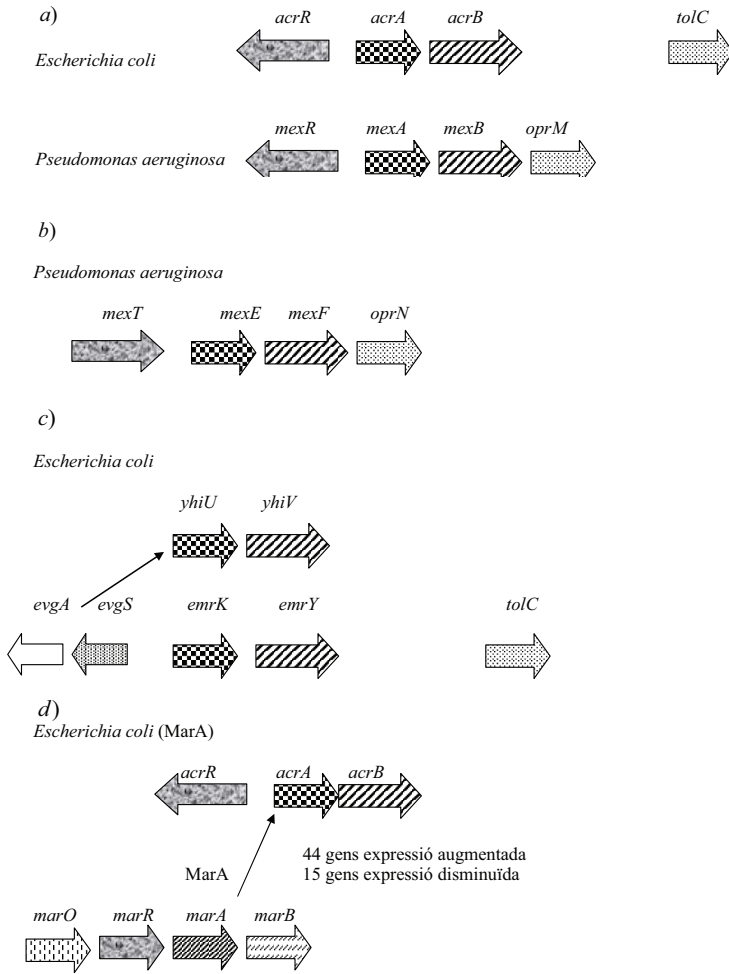


FIGURA 4. a) Regulació mitjançant un repressor local. b) Regulació mitjançant un activador local. c) Sistema de doble component. d) Regulador global.

aquest microorganisme ha estat àmpliament estudiat des d'aquest punt de vista, la majoria d'estudis en els quals hom ha intentat esbrinar el paper de la sobreexpressió d'aquests sistemes d'expulsió activa en el desenvolupament de multiresistència durant el tractament s'han realitzat amb aquest microorganisme. Ziha-Zarifi *et al.* (1999) van estudiar vint-i-un malalts amb infeccions per *P. aeruginosa* en els quals s'havia aïllat una soca multiresistent durant el tractament, i hom va observar

que onze aïllaments multiresistents presentaven una sobreexpressió de MexAB-OprM. Un resultat similar va ésser obtingut per Le Thomas *et al.* (2001), els quals van aïllar una soca multiresistent de *P. aeruginosa* a partir d'un malalt tractat amb ciprofloxacina en monoteràpia. La soca multiresistent tenia una CIM de ciprofloxacina de 32 mg/l, mentre que la soca inicial tenia una CIM de 0,25 mg/l. Els investigadors associaren aquest increment a la sobreexpressió de MexAB-OprM. Carmeli

et al. (1999) fan un seguiment de 271 pacients amb infeccions per *P. aeruginosa* i tractats amb diverses teràpies antimicrobianes (ciprofloxacina, imipenem, ceftazidima i piperacil·lina), i observen que en vint-i-vuit pacients (10,2%) s'aïlla durant el tractament una soca resistent i els resultats indiquen que l'agent antimicrobià que ocasiona aparició de soques multiresistents amb més freqüència és l'imipenem.

El millor tractament per a infeccions ocasionades per bacteris en els quals es pot produir amb facilitat una sobreexpressió de sistemes d'expulsió activa no és conegut, però l'optimització de l'agent antibacterià, i també la combinació de diversos agents antibacterians que siguin substrats de diferents sistemes d'expulsió activa poden representar una estratègia terapèutica raonable.

INHIBIDORS DELS SISTEMES D'EXPULSIÓ ACTIVA

Els mecanismes d'expulsió activa es troben actualment àmpliament reconeguts com a components majoritaris de resistència en diverses classes d'agents antibacterians.

Per combatre la resistència mitjançada pels sistemes d'expulsió activa existeixen dues possibilitats:

a) Modificacions estructurals dels agents antimicrobians disponibles actualment perquè es vegin afectats mínimament per aquests sistemes.

b) Descobriment i desenvolupament d'agents terapèutics capaços d'inhibir l'activitat transportadora de les bombes d'expulsió activa, i que puguin utilitzar-se en combinació amb els antimicrobians més utilitzats en teràpia clínica.

Com a exemple, tenim una nova classe de tetraciclins semisintètics, les *glicilciclins*, que són capaces d'evitar la resistència mitjançada per bombes d'expulsió activa, ja que no són reconegudes per la proteïna transportado-

ra (Sum *et al.*, 1998). També s'han descobert fluoroquinolones que no es veuen afectades pels sistemes d'expulsió NorA i PmrA presents en bacteris grampositius (Lomovskaya i Watkins, 2001).

Recentment, s'ha demostrat l'existència de diverses substàncies capaces d'inhibir aquests sistemes i, per tant, capaces de millorar considerablement l'activitat antibacteriana de molts antibiòtics (Lomovskaya i Watkins, 2001).

Abans d'utilitzar un determinat inhibidor, primer s'ha de demostrar la seva bona farmacocinètica, la seva mínima toxicitat i la compatibilitat amb els diferents agents antimicrobians amb els quals s'administrarà. A més, s'han de detectar els agents antimicrobians i les dianes bacterianes en les quals serà més productiu emprar-los. Els factors que s'han de tenir en compte per assegurar-ne l'òptima activitat i, per tant, aconseguir una eficiència clínica total, són (Lomovskaya i Watkins, 2001):

— Estudiar la prevalença de la resistència mitjançada pels sistemes d'expulsió.

— Avaluar la multiplicitat de les bombes d'expulsió activa.

— Estudiar l'existència d'altres factors responsables de resistència a un determinat agent antibacterià.

— Estudiar la interacció entre diferents mecanismes de resistència.

A més, per qualificar aquests compostos com a bons i veritables inhibidors s'han de complir els criteris següents (Lomovskaya i Watkins, 2001):

— Han de potenciar l'activitat dels múltiples substrats de la bomba a inhibir.

— No han de potenciar l'activitat dels agents antimicrobians que no són expulsats per la bomba.

— No han de tenir activitat en soques bacterianes que no presenten bombes d'expulsió activa.

— Han d'augmentar l'acumulació intracel·lular i disminuir l'expulsió dels substrats de les bombes.

TAULA 1. *Inhibidors de sistemes d'expulsió activa (Lomovskaya i Watkins, 2001)*

Inhibidors	Bombes inhibides		Agents antimicrobians afectats (↓ CMI ^e)
	Transportadors específics	Transportadors MDR ^d	
13-CPTC ^a	Tet A		Doxiciclina
	Tet B		Tetraciclina, doxiciclina
UK-57,562	Tet C		Tetraciclina
Ro 07-3149	Tet K		Tetraciclina
Reserpina		NorA, PmrA, MdfA, EmrE	Fluoroquinolones
INF 55,271		NorA, PmrA	Fluoroquinolones
MC-207,110		Mex, AcrAB	Levofloxacina, ciprofloxacina
CCCP ^b		AcrAB ^c	Fluoroquinolones, tetraciclina, cloramfenicol

^a 13-CPTC: 13-ciclopentil tetraciclina.

^b CCCP: carbonil cianida m-clorfenilhidrazona. És un inhibidor del flux de protons (PMF, de l'anglès *proton motive force*).

^c Okusu *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1994.

^d MDR: de l'anglès *multidrug resistance*.

^e CMI: Concentració mínima inhibidora.

— No han d'afectar el flux de protons que es produeix a la membrana interna.

Aquest esquema s'ha utilitzat amb èxit per identificar inhibidors de la bomba NorA de *S. aureus* i les bombes Mex de *P. aeruginosa*.

Normalment, els compostos sintètics o extractes de productes naturals capaços d'inhibir el creixement bacterià en presència però no en absència d'agents antimicrobians serien ideals com a inhibidors.

A la taula 1 trobem els inhibidors més importants de sistemes d'expulsió activa tant de bacteris grampositius com gramnegatius (Lomovskaya i Watkins, 2001).

Podem dir que els inhibidors que han mostrat més activitat enfront de bombes d'expulsió de múltiples antimicrobians, i que, per tant, tindrien una repercussió més important, són la reserpina i l'MC-207,110.

a) La *reserpina* (vegeu la figura 5) és un alcaloide que primerament va ésser conegut com a inhibidor de les bombes d'expulsió activa de bacteris grampositius, el sistema Bmr de *B. subtilis* (Neyfakh *et al.*, 1991) i NorA de *S. aureus*, que fa que les soques que la presenten manifestin un increment en la sensibilitat enfront de les fluoroquinolones hidrofíliques, però no hidrofòbiques (Kaatz i Seo, 1997), i en

soques de *S. pneumoniae* on s'ha trobat que és capaç de disminuir la CIM de certes fluoroquinolones. A més, cal esmentar que el tractament amb reserpina de soques de *S. aureus* i *S. pneumoniae* no solament inhibeix els transportadors actius sinó que també és capaç de prevenir l'emergència de resistència en aquestes soques (Markham i Neyfakh, 1996; Markham, 1999).

També, s'ha descrit la seva activitat en bacteris gramnegatius, com en el cas de *Bacteroides fragilis* (Miyamae *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 1999).

b) *MC-207,110*: Fenil-arginil-β-naftilamida (vegeu la figura 6). És un dipèptid d'amida sintètic de baix pes molecular (Renau *et al.*, 1999). S'ha demostrat que posseeix una mínima activitat antibacteriana intrínseca i que inhibeix els sistemes d'expulsió activa de tipus Mex de *P. aeruginosa*, i disminueix la CIM de levofloxacina en un mínim de vuit vegades (Renau *et al.*, 1999). També inhibeix el sistema AcrAB d'*E. coli* i de *S. typhimurium* (Mazzariol *et al.*, 2000; Baucheron *et al.*, 2002).

Com a punt important cal destacar la necessitat d'incentivar i insistir en la recerca de nous compostos d'aquest tipus capaços d'inhibir els sistemes d'expulsió activa presents

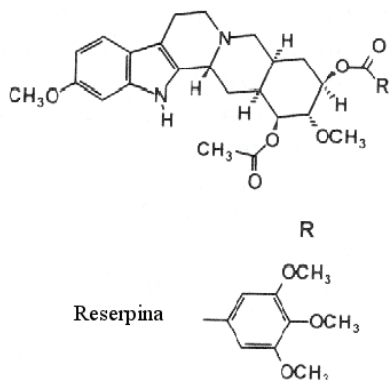


FIGURA 5. Estructura química de la molècula de reserpina.

en la majoria de bacteris (tant grampositius com gramnegatius) i, per tant, capaços de potenciar l'efecte de l'agent antimicrobià amb el qual s'administrin. Aquests compostos podrien aportar una gran quantitat d'efectes beneficiosos, però manquen encara molts estudis perquè aquests inhibidors puguin ésser introduïts en clínica i perquè puguin estar totalment acceptats per la comunitat mèdica.

BIBLIOGRAFIA

- ADEWOYE, L.; SUTHERLAND, A.; SRIKUMAR, R.; POOLE, K. (2002). «The MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: characterization of mutations compromising activity». *J. Bacteriol.*, vol. 184, pàg. 4308-4312.
- BARBOSA, T.; LEVY, S. B. (2000). «Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA». *J. Bacteriol.*, vol. 182, pàg. 3467-3474.
- BAUCHERON, S.; IMBERECHTS, H.; CHASLUS-DANCLA, E.; CLOECKAERT, A. (2002). «The AcrAB multidrug transporter plays a major role in high level fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium phage type DT204». *Microb. Drug Resist.*, vol. 8, pàg. 281-289.
- BORGES-WALMSLEY, M. I.; WALMSLEY, A. R. (2001). «The structure and function of drug pumps». *Trends in Microbiol.*, vol. 9, pàg. 71-79.
- CARMELI, I.; TROILLET, N.; ELIOPOULOS, G. M.; SAMORE, M. H. (1999). «Emergence of antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Comparison of risks associated with different antipseudomonal agents». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 1379-1382.
- EVANS, K.; ADEWOYE, L.; POOLE, K. (2001). «MexR repressor of the *mexAB-oprM* multidrug efflux operon of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of MexR binding sites in the *mexA-mexR* intergenic region». *J. Bacteriol.*, vol. 183, pàg. 807-812.
- GRKOVIC, S.; BROWN, M. H.; SKURRAY, R. A. (2001). «Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria». *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 12, pàg. 225-237.
- JELLENRITTER, A. S.; KERN, W. V. (2001). «Enhanced expression of multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 45, pàg. 1467-1472.
- KAATZ, G. W.; SEO, S. M. (1997). «Mechanisms of fluoroquinolone resistance in genetically related strains of *Staphylococcus aureus*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 41, pàg. 2733-2737.
- KÖHLER, T.; EPP, S. F.; CURTY, L. K.; PECHERE, J. C. (1999). «Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system *Pseudomonas aeruginosa*». *J. Bacteriol.*, vol. 181, pàg. 6300-6305.
- LE THOMAS, I.; COVETDIC, G.; CLERMONT, O.; BRAHIMI, N.; PLASIAT, P.; BINGEN, E. (2001). «*In vivo* selection of a target/efflux double mutant of *Pseudomonas aeruginosa* by ciprofloxacin therapy». *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 48, pàg. 553-555.
- LI, X. Z.; LIVERMORE, D. M.; NIKAIIDO, H. (1994). «Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol and norfloxacin». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, pàg. 1732-1741.
- LOMOVSKAYA, O.; WATKINS, W. (2001). «Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria». *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 3, pàg. 225-236.
- MA, D.; ALBERTI, M.; LYNCH, C.; NIKAIIDO, H.; HEARST, J. E. (1996). «The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals». *Mol. Microbiol.*, vol. 19, pàg. 101-112.
- MARKHAM, P. N. (1999). «Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in *Streptococcus pneumoniae* by the

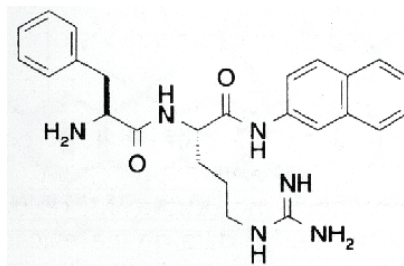


FIGURA 6. Estructura de la molècula de MC-207,110.

- multidrug efflux inhibitor reserpine». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 988-989.
- MARKHAM, P. N.; NEYFAKH, A. A. (1996). «Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 40, pàg. 2673-2674.
- MAZZARIOL, A.; TOKUE, Y.; KANEGAWA, T. M.; CORNAGLIA, G.; NIKAIIDO, H. (2000). «High-level fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* overproduce multidrug efflux protein AcrA». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, pàg. 3441-3443.
- MIYAMAE, S.; NIKAIIDO, H.; TANAKA, Y.; YOSHIMURA, F. (1998). «Active efflux of norfloxacin by *Bacteroides fragilis*». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 42, pàg. 2119-2121.
- NELSON, M. L. (2002). «Modulation of antibiotic efflux in bacteria». *Cur. Med. Chem-Antiinfect. Agents.*, vol. 1, pàg. 3.
- NEYFAKH, A. A.; BIDNENKO, B. E.; CHEN, L. B. (1991). «Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: similarities and dissimilarities with the mammalian system». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 88, pàg. 4781-4785.
- NIKAIIDO, H. (1994). «Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux». *Science*, vol. 264, pàg. 382-388.
- NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. (2002). «EbgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in *Escherichia coli*». *J. Bacteriol.*, vol. 184, pàg. 2319-2323.
- OKUSU, H. D.; MA, D.; NIKAIIDO, H. (1996). «AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic-resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants». *J. Bacteriol.*, vol. 178, pàg. 306-308.
- PETERSON, M. L.; HOVDE, L. B.; WRIGHT, D. H.; HOANG, A. D.; RADDATZ, J. K.; BOYSEN, P. J.; ROSTCHOFER, J. C. (1999). «Fluoroquinolone resistance in *Bacteroides fragilis* following sparfloxacin exposure». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 2251-2255.
- PUTMAN, M.; VEEN, H. W. VAN; KONINGS, W. N. (2000). «Molecular properties of bacterial multidrug transporters». *Microbiol. Molec. Rev.*, vol. 64, pàg. 672-693.
- RAHMATI, S.; YANG, S.; DAVIDSON, A. L.; ZECHIEDRICH, E. L. (2002). «Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA». *Mol. Microbiol.*, vol. 43, pàg. 677-685.
- RENAU, T. E.; LEGER, R.; FLAMME, E. M.; SANGALANG, J.; SHE, M. W.; YEN, R.; GANNON, C. L.; GRIFFITH, D.; CHAMBERLAND, S.; LOMOVSKAYA, O.; HECKER, S. J.; LEE, V. J.; OHTA, T.; NAKAYAMA, K. (1999). «Inhibitors of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa* potentiate the activity of the fluoroquinolone antibacterial levofloxacin». *J. Med. Chem.*, vol. 42, pàg. 4928-4931.
- SUM, P. E.; SUM, F. W.; PROJAN, S. J. (1998). «Recent developments in tetracycline antibiotics». *Curr. Pharm. Des.*, vol. 4, pàg. 119-132.
- ZIHA-ZARIFI, I.; LLANES, C.; KÖHLER, T.; PECHERE, J. C.; PLESIAI, P. (1999). «*In vivo* emergence of multidrug resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM». *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 43, pàg. 287-291.