

Revisión

Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos

P. Sánchez Díaz

*Departamento de Biotecnología Microbiana, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC),
Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid*

RESUMEN

Se denominan sistemas MDR (Multi Drug Resistance) a una serie de transportadores que son capaces de expulsar un amplio número de sustratos no relacionados estructuralmente entre sí. Este tipo de sistemas se describieron inicialmente en eucariotas a finales de los años 1980, pero cada vez se dispone de más ejemplos de sistemas MDR bacterianos implicados en la resistencia a los antimicrobianos. La expresión de estos sistemas MDR, al menos en condiciones de laboratorio, suele estar reprimida, aunque en ocasiones se permite una expresión inicial del sistema, causante en parte de la elevada resistencia intrínseca a los antimicrobianos de ciertos microorganismos. Además, la sobreexpresión de estos sistemas MDR, bien por la inducción de su expresión, bien como consecuencia de la aparición de mutaciones en sus elementos reguladores, también es importante en la resistencia adquirida. En esta revisión se han intentado resumir las características más importantes de los sistemas MDR descritos en bacterias gramnegativas, así como los mecanismos que regulan su expresión.

Palabras clave: Multirresistencia - Sistemas MDR - Regulación

MDR efflux pumps and antimicrobial resistance

SUMMARY

The term MDR (Multi Drug Resistance) system refers to a group of transporters which are able to expulse a wide range of quite different substrates. While this type of system was first described in eukaryotic cells in the late 1980s, the presence of MDR efflux-pumps in bacteria showing resistance to several drugs has been increasingly reported in the literature. Under laboratory conditions the expression of these MDR systems is usually down-regulated. On occasion, basal expression of these efflux pumps is allowed in wild type strains, thus suggesting a role of these MDR systems in the intrinsic of these microorganisms resistance to antibiotics. On the other hand, overexpression of these MDR efflux pumps, after induction or because of the emergence of mutations in their regulatory elements, is also important in acquired resistance to antibiotics. This review summarizes the most relevant features of the MDR systems described in bacteria, as well as the mechanisms that regulate their expression.

Key words: Multidrug resistance - MDR efflux pumps - Regulation

INTRODUCCIÓN

Las bacterias gramnegativas se caracterizan por ser intrínsecamente más resistentes a los antimicrobianos que las grampositivas. Tradicionalmente, esta elevada resistencia intrínseca se atribuía a una menor permeabilidad debida a la presencia de la membrana externa (1). La membrana externa de los gramnegativos actúa como una barrera física que retarda los mecanismos de difusión. Sin embargo, este mecanismo por sí solo no sería capaz de impedir la entrada de los antimicrobianos. Fue a finales de la década de 1980 cuando se descubrieron los primeros sistemas de expulsión activa en procariontes (tanto grampositivos como gramnegativos (1)). Éstos, junto a la membrana externa, sí podían justificar la resistencia intrínseca de estas bacterias.

Se denominan sistemas de multirresistencia (MDR) a una serie de transportadores que son capaces de expulsar, de forma relativamente inespecífica, un amplio número de sustratos no relacionados entre sí estructuralmente. Este tipo de transportadores se describió por primera vez en eucariotas. Se identificó una proteína (glucoproteína P) que era capaz de conferir resistencia a la terapia anticancerígena mediante un mecanismo de transporte activo acoplado a la hidrólisis de ATP (2).

Los primeros sistemas MDR descritos en bacterias fueron QacA en *Staphylococcus aureus* (3) y EmrB en *Escherichia coli* (4). Desde entonces, cada vez son más los sistemas MDR identificados en bacterias, implicados tanto en resistencia intrínseca como en resistencia adquirida. Además, el análisis de los genomas de los microorganismos secuenciados parece indicar que este tipo de transportadores es ubicuo (5, 6). [Para una clasificación de todos los presuntos transportadores deducidos a partir de la secuencia de 20 microorganismos (eucariotas y procariontes) se recomienda visitar la página web <http://www-biology.ucsd.edu/~ipaulsen/transport/>].

Desde el descubrimiento de los sistemas MDR, una de las incógnitas que se planteó fue el mecanismo molecular de reconocimiento entre transportador y sustrato. Se desconocía cómo un único transportador era capaz de expulsar sustratos tan distintos estructuralmente y a la vez podía discriminar entre sustratos y componentes celulares. La dificultad que entraña la purificación y cristalización de las proteínas de estos transportadores hace que aún no se conozcan de un modo preciso las bases moleculares de la interacción de sustrato y transportador. Para avanzar en este conocimiento se han obtenido mutantes dirigidos de distintos transportadores. Con estos estudios se ha identificado una serie de residuos de aminoácidos cuya sustitución afecta a la función del transportador. Se ha visto que la presencia de residuos ácidos (ácido aspártico o glutámico)

embebidos en un entorno altamente hidrófobo como es la membrana citoplasmática es esencial para el reconocimiento y el transporte de moléculas cargadas positivamente. Estos residuos parecen formar parte de centros activos con alta afinidad por este tipo de compuestos (7-13). Por otra parte, recientemente se ha descubierto que la presencia de ciertos residuos de arginina en el transportador QacA de *S. aureus* (10) y de lisina en los transportadores MexB y MexF de *Pseudomonas aeruginosa*, también es esencial para la función de la proteína (11, 13).

Además del reconocimiento entre sustrato y transportador, otras incógnitas que se han planteado son la función que cada una de las proteínas de los sistemas de bombeo multicomponente desempeña durante el transporte, y el mecanismo de ensamblado de estos sistemas.

En cuanto a la función de cada una de las proteínas, Zgurskaya y Nikaido (14-16) han estudiado el mecanismo molecular del sistema de bombeo de AcrAB-TolC de *E. coli*. Este sistema multicomponente está formado por tres proteínas:

- AcrB: proteína de la membrana interna perteneciente a la familia de transportadores *Resistance Nodulation cell Division* (RND).
- AcrA: proteína accesoria del espacio periplásmico.
- TolC: porina de la membrana externa.

Los estudios realizados por estos autores indican que las proteínas AcrA y AcrB interactúan íntimamente, mientras que la asociación de TolC al complejo AcrAB es transitoria (15). Además, cada vez se tienen más indicios (14, 16) de que el papel de AcrA es poner en contacto las membranas interna y externa durante el transporte (Fig. 1).

Por otra parte, los ensayos realizados (17) con transportadores quiméricos AcrB/MexB han puesto de manifiesto que la región comprendida entre los residuos T60-V612 de ambos transportadores es esencial para su interacción con el componente del espacio periplásmico (AcrA o MexA). Además, también se ha demostrado que los dominios periplásmicos de los transportadores AcrB (*E. coli*) y MexD (*P. aeruginosa*) son esenciales tanto para el ensamblado del sistema multicomponente (18) como para el reconocimiento de los sustratos (17, 19).

También sigue siendo una incógnita la función biológica de este tipo de transportadores. El hecho de que sean ubicuos y de que en el cromosoma de una misma bacteria se hayan identificado numerosos genes que codifican distintos sistemas de transporte (5, 6), indica que la expulsión de fármacos debe ser un efecto colateral de la función principal para la que se han seleccionado. De este modo, se ha especulado que estén implicados en mecanismos generales

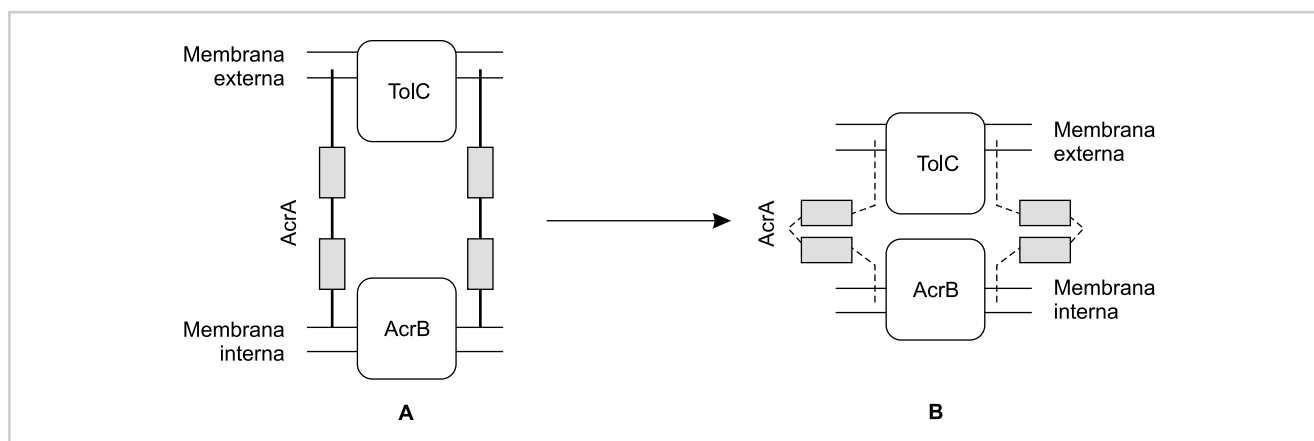


Figura 1. Mecanismo de acción de los sistemas de expulsión multicomponente de gramnegativos. Modelo propuesto por Zgurskaya y Nikaido (15, 17). **A:** Disposición de los componentes del sistema de bombeo en reposo. **B:** Disposición de los componentes del sistema durante el transporte. Según este modelo, la proteína de fusión de membrana (AcrA) tendría como función poner en contacto las proteínas de las membranas interna (AcrB) y externa (TolC).

de detoxificación. Se podría atribuir esta función al sistema AcrAB de *E. coli*, que expulsa sales biliares (20), y a los sistemas cuya expresión es mayor en fases tardías del crecimiento y bajo estrés de fase estacionaria, por ejemplo MexAB-OprM de *P. aeruginosa* (21, 22).

También se ha sugerido que estos sistemas pudieran estar implicados en la señalización intercelular. Se sabe que los sistemas MexAB-OprM (23, 24) y MexEF-OprN (25) de *P. aeruginosa* son capaces de expulsar el autoinductor del sistema de señalización de *quorum sensing* 3-oxo-C₁₂-homoserín lactona (C12-HSL). Otro dato que refuerza la hipótesis anterior es el descubrimiento en *P. aeruginosa* de una quinolona autoinductora del sistema de *quorum sensing*. Esta nueva molécula se ha denominado *Pseudomonas Quinolone Signaling* (PQS) (26). La importancia de este descubrimiento estriba en que las fluoroquinolonas, que son antibióticos sintéticos, son sustratos preferenciales de los sistemas MDR (27, 28). Por lo tanto, cabría la posibilidad de que dichos sistemas MDR tuvieran como función original la expulsión de quinolonas naturales. De momento, esta hipótesis no ha sido analizada.

Dada la repercusión que los sistemas MDR tienen en la resistencia a los antimicrobianos (son ubicuos, confieren resistencia intrínseca, tienen un amplio número de sustratos, favorecen la aparición de mutantes con elevados grados de resistencia, etc.), cada vez son mayores los esfuerzos invertidos en la búsqueda de posibles inhibidores.

Los primeros inhibidores de sistemas MDR que se descubrieron fueron la reserpina y el carbonilcianuro de *m*-clofenoilhidrazona (CCCP). Ambos compuestos actúan bloqueando la obtención de la energía necesaria en el transporte. La reserpina actúa inhibiendo la actividad ATPasa y el CCCP desacoplando el gradiente de protones.

Estos inhibidores se han utilizado en el laboratorio para la caracterización de sistemas MDR de grampositivos (reserpina y CCCP) y gramnegativos (CCCP). Aunque se ha visto que la reserpina, además de inhibir el transporte, también es capaz de disminuir la emergencia de mutantes resistentes (29, 30), su elevada toxicidad (al igual que en el caso del CCCP) hace inviable cualquier aplicación terapéutica.

Recientemente se han identificado nuevos inhibidores MDR que potencian la actividad del ciprofloxacino en *S. aureus* (31), del levofloxacino en *P. aeruginosa* (32) y del norfloxacino en *Acinetobacter baumannii* y *Stenotrophomonas maltophilia* (33), a la vez que previenen la aparición de mutantes resistentes (31, 32). Quizás estos nuevos inhibidores sí puedan utilizarse en clínica.

CLASIFICACIÓN DE LOS TRANSPORTADORES MDR PROCARIOTAS

Los sistemas MDR descritos en procariotas pertenecen a cinco familias de proteínas transportadoras:

- Superfamilia ABC (*ATP Binding Cassette*) (34).
- Superfamilia MFS (*Major Facilitator Superfamily*) (35).
- Superfamilia RND (*Resistance Nodulation cell Division*) (36).
- Familia SMR (*Small Multidrug Resistance*) (7).
- Familia MATE (*Multidrug and Toxic compound Extrusion*) (37).

En la Tabla 1 se detallan los transportadores MDR más representativos de cada una de las familias, así como sus características más destacadas.

Tabla 1. Clasificación de los transportadores MDR.

Transportador	Organismo	Sustratos	Ref.
Superfamilia ABC			
Glucoproteína P	Mamíferos	Cationes metálicos, péptidos cíclicos y lineales, lípidos, hormonas esteroideas, alcaloides, colchicina y actinomicina D, entre otros	(2)
LmrA	<i>L. lactis</i>	Similar al de la glucoproteína P	(37)
Superfamilia MFS			
QacA	<i>S. aureus</i>	Cationes lipofílicos monovalentes y divalentes y algunos antimicrobianos (fluoroquinolonas, cloranfenicol)	(10)
NorA	<i>S. aureus</i>	Antimicrobianos (fluoroquinolonas, cloranfenicol), detergentes y cationes lipofílicos (bromuro de etidio)	(39, 117)
TetA	<i>E. coli</i>	Tetraciclina	(40)
EmrB*	<i>E. coli</i>	Tetraclorosalicilamido, tiolactomicina	(4, 118)
MdfA	<i>E. coli</i>	Cationes lipofílicos (bromuro de etidio, tetrafenilfosfonio, rodamina y benzalconio), antimicrobianos (tetraciclina, rifampicina, cloranfenicol y eritromicina) e isopropil beta D-tiogalactopiranosido (IPTG)	(40, 119)
MdtD	<i>E. coli</i>	Desconocidos	(42, 43)
EmrY*	<i>E. coli</i>	Desoxicolato	(68)
LmrP	<i>L. lactis</i>	Cationes lipofílicos (bromuro de etidio, Hoechst 33342, tetrafenilfosfonio)	(44)
Bmr	<i>B. subtilis</i>	Similar a NorA (fluoroquinolonas, detergentes, etc.)	(45, 115)
Blt	<i>B. subtilis</i>	Similar a NorA (fluoroquinolonas, detergentes, etc.)	(115, 120)
Superfamilia RND			
AcrB *	<i>E. coli</i>	Sales biliares y sus derivados, naranja de acridina, tetraciclina, eritromicina, ácido fusárico, novobiocina, dodecil sulfato sódico (SDS), desoxicolato y mitomicina C	(15, 47)
AcrF*	<i>E. coli</i>	Igual que AcrB	(15, 47)
AcrD ₂ *?	<i>E. coli</i>	Aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, neomicina, kanamicina y tobramicina), tetraciclina, ácido nalidíxico, norfloxacin, novobiocina, SDS y desoxicolato	(48, 72)
MdtB/MdtC*	<i>E. coli</i>	Desoxicolato y novobiocina	(42, 43)
YhiV*	<i>E. coli</i>	Desoxicolato, doxorubicina, rodamina, eritromicina, cristal violeta, benzalconio y SDS	(68)
MtrD*	<i>N. gonorrhoeae</i>	Antimicrobianos (eritromicina, rifampicina, azitromicina), detergentes aniónicos, péptidos antimicrobianos, sales biliares, hormonas esteroideas y otros compuestos hidrofóbicos	(49)
FarB*	<i>N. gonorrhoeae</i>	Ácidos grasos de cadena larga (oleico, linoléico y palmítico)	(76)
MexB*	<i>P. aeruginosa</i>	Antimicrobianos (fluoroquinolonas, betalactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprima, sulfamidas), triclosán, solventes orgánicos, detergentes, inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos, C12-HSL	(50, 70)
MexD*	<i>P. aeruginosa</i>	Fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, tetraciclina, trimetoprima, betalactámicos (excepto carbapenemes) y triclosán	(51, 70)
MexF*	<i>P. aeruginosa</i>	Fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprima y triclosán	(52)
MexY*	<i>P. aeruginosa</i>	Aminoglucósidos, tetraciclina, eritromicina y fluoroquinolonas	(53, 70)
MexK*	<i>P. aeruginosa</i>	Triclosán, tetraciclina y eritromicina	(54)
SmeE*	<i>S. maltophilia</i>	Tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, macrólidos y novobiocina	(55)
SmeB*	<i>S. maltophilia</i>	Aminoglucósidos, fluoroquinolonas y, en menor medida, betalactámicos	(56)
Familia SMR			
Smr	<i>S. aureus</i>	Cationes lipofílicos (cristal violeta, bromuro de etidio, tetrafenilfosfonio, compuestos de amonio cuaternario), detergentes y tetraciclina	(7)
EmrE	<i>E. coli</i>	Cationes lipofílicos (bromuro de etidio y paraquat)	(9)
Familia MATE			
NorM	<i>V. parahaemolyticus</i>	Fluoroquinolonas, kanamicina y estreptomicina	(57, 58)
YdhE	<i>E. coli</i>	Igual que NorM	(57)

*Forman parte de un sistema de transporte multicomponente.

Superfamilia ABC

A esta superfamilia pertenecen diversos transportadores de fármacos, azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, péptidos, etc. Como se deduce del nombre de la superfamilia, todos los transportadores son dependientes de la hidrólisis de ATP. Son transportadores tipo ABC el sistema MDR LmrA de *Lactococcus lactis* (38) y su homólogo humano la glucoproteína P (2).

Superfamilia MFS

Dentro de la superfamilia MFS se han identificado varias subfamilias implicadas en el transporte de fármacos. A dos de ellas, DHA12 [con doce segmentos transmembrana (TMS)] y DHA14 (con catorce TMS) pertenecen los sistemas QacA (3) y NorA (39) de *S. aureus*, TetA (40), EmrB (4), MdfA (41) y MdtD (42, 43) de *E. coli*, LmrP de *L. lactis* (44) y Bmr de *Bacillus subtilis* (45).

A diferencia de la superfamilia ABC, los transportadores MFS son dependientes de la fuerza protón motriz.

Superfamilia RND

De esta superfamilia, sólo una de las familias parece participar en el transporte de fármacos. A ella pertenecen la mayoría de los transportadores MDR de las bacterias gramnegativas (46): AcrB (47), AcrD (4), MdtB y MdtC (42, 43) de *E. coli*, MtrD (49) de *Neisseria gonorrhoeae*, MexB (50), MexD (51), MexF (52), MexY (53) y MexK (54) de *P. aeruginosa*, y SmeE (55) y SmeB (56) de *S. maltophilia*, entre otros.

Estas proteínas se caracterizan por poseer doce TMS y estar acopladas al potencial de membrana. En otro apartado de esta revisión se comentan las características y la organización génica de los sistemas RND de las bacterias gramnegativas más importantes desde el punto de vista de la resistencia a los antimicrobianos, así como sus mecanismos de regulación.

Algunos transportadores de las superfamilias ABC, MFS y RND forman parte de sistemas multicomponente asociados a proteínas de fusión de membrana (MFP) y a factores de membrana externa (OMF) durante la expulsión de los sustratos (46). En este sentido, EmrAB-TolC y AcrAB-TolC de *E. coli*, MexAB-OprM de *P. aeruginosa*, MtrCDE de *N. gonorrhoeae* y SmeDEF de *S. maltophilia* constituyen cuatro ejemplos de sistemas multicomponente implicados en la resistencia a los antimicrobianos.

Familia SMR

Esta familia contiene una serie de pequeñas proteínas con cuatro TMS que, acopladas al potencial de membrana, expulsan antimicrobianos y detergentes, entre otros compuestos. Pertenecen a esta superfamilia los transportadores Smr de *S. aureus* (7) y EmrE (o MvrC) de *E. coli* (9).

Familia MATE

Se han encontrado proteínas de esta familia de transportadores en procariotas, levaduras y plantas. Estas proteínas constan de doce TMS (37) y las dos que se han caracterizado en procariotas funcionan intercambiando moléculas de sustrato por iones Na⁺ (57). A esta superfamilia pertenece NorM de *Vibrio parahaemolyticus* (58) y su homóloga YdhE identificada en *E. coli* (58). Aunque el número de sustratos no es idéntico para NorM e YdhE, ambas confieren resistencia a ciertas quinolonas, kanamicina y estreptomycin (57).

SISTEMAS TRANSPORTADORES DE FÁRMACOS RND EN BACTERIAS GRAMNEGATIVAS

Como ya se ha mencionado, la mayoría de los transportadores MDR de gramnegativos pertenecen a la superfamilia RND (46). Este tipo de sistemas suele ser la causa de la resistencia intrínseca de estos microorganismos a los antimicrobianos. Por otra parte, su sobreexpresión contribuye también a la resistencia adquirida.

La regulación de la expresión de los primeros sistemas de bombeo caracterizados en gramnegativos (AcrAB, MtrCDE, MexAB, etc.) es similar. Generalmente, su expresión está regulada por la acción de una proteína represora local, y la aparición de un fenotipo de multiresistencia se debe a mutaciones en los genes reguladores locales (59-65). Recientemente se ha visto que algunos de estos sistemas MDR también están regulados por activadores globales (por ejemplo MarA, Rob, SoxS y MtrA) (66). También se han caracterizado sistemas MDR regulados por activadores locales (67) y por sistemas de transducción de señales de doble componente (42, 43, 56, 68). La regulación de la expresión de estos sistemas se tratará con más detalle en otro apartado.

Características y organización génica de los sistemas RND más importantes de gramnegativos

La presencia de la membrana externa en gramnegativos ha condicionado la estructura de los sistemas RND. Para que

el transporte sea efectivo es necesario atravesar la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la membrana externa. Esto se consigue mediante un sistema de bombeo multicomponente que suele estar constituido por tres proteínas (Fig. 1): una proteína transportadora (RND) en la membrana interna que está acoplada al potencial de membrana, una proteína de fusión de membrana (MFP) y una porina en la membrana externa (OMF). Generalmente, los tres componentes están codificados en genes adyacentes formando parte de un operón. Sin embargo, en ocasiones la porina puede transcribirse de forma independiente y asociarse a más de un sistema de bombeo; tal es el caso de TolC de *E. coli* (42, 68, 69), OprM de *P. aeruginosa* (54, 70), MtrE de *N. gonorrhoeae* (71) y, posiblemente, SmeC de *S. maltophilia* (56).

En los siguientes apartados se resumen las características de los sistemas MDR de gramnegativos mejor estudiados. En la Fig. 2 se muestra un esquema de la organización génica de todos ellos.

Sistemas Acr de *E. coli*

En *E. coli* se han caracterizado tres transportadores Acr (*ACRIDINE RESISTANCE*): AcrAB, AcrEF (47) y AcrD (43). AcrAB y AcrEF son los sistemas de bombeo más importantes de este microorganismo desde el punto de vista de la resistencia a los antimicrobianos. Recientemente se ha visto que AcrD, que en un principio se pensó que únicamente confería resistencia a los aminoglucósidos (48), también es capaz de expulsar un amplio número de sustratos (72).

Los sistemas AcrAB y AcrEF están formados por una proteína transportadora de la superfamilia RND (AcrB/AcrF) y una proteína de fusión de membrana (AcrA/AcrE). Ambos sistemas se transcriben formando un operón (47) cuya expresión está reprimida por el producto de un gen regulador (*acrR* y *acrS*, respectivamente) localizado corriente arriba y en la cadena complementaria de los genes del operón (59, 73) (Fig. 2). A diferencia de los anteriores, el transportador AcrD no forma parte de un operón, ni por el momento se ha identificado su gen regulador local (48) (Fig. 2). Más adelante se comentarán algunos aspectos de la regulación de estos sistemas MDR.

Los sistemas AcrAB y AcrEF funcionan asociados a la porina TolC, que se transcribe de forma independiente. Como ya se ha mencionado, parece que la función de la proteína AcrA es poner en contacto las proteínas AcrB y TolC para llevar a cabo la expulsión de los compuestos (14, 16) (Fig. 1).

En cuanto a la cantidad de compuestos que estos sistemas pueden expulsar, parece que el sustrato natural de AcrAB lo constituyen las sales biliares, ya que es por este

sustrato y por sus derivados (taurocolato y glucocolato) por los que el sistema tiene mayor afinidad (15). También son sustratos de estos sistemas el naranja de acridina, la tetraciclina, el cloranfenicol, la eritromicina, el ácido fusárico, la novobiocina, el dodecil sulfato sódico (SDS), el desoxicolato y la mitomicina C.

El transportador AcrD, por sí solo, confiere resistencia a los aminoglucósidos (amikacina, gentamicina, neomicina, kanamicina y tobramicina) (48) y, quizás formando parte de un sistema multicomponente, a la tetraciclina, el ácido nalidíxico, el norfloxacin, la novobiocina, SDS y el desoxicolato (48, 54, 72).

De forma análoga, en *P. aeruginosa* se ha descrito la existencia de un sistema RND bicomponente (54). Este sistema, que se ha denominado MexJK, es capaz de conferir resistencia al biocida triclosán, pero necesita a la porina OprM para expulsar antimicrobianos (54).

A la vista de sus resultados y de los obtenidos por otros autores (48), Chuanchuen y cols. (54) han propuesto clasificar los transportadores RND en tres categorías:

- 1) Sistemas monocomponente, integrados por una proteína de la membrana interna (por ejemplo AcrD) (48), que permite la expulsión de tóxicos hidrófilos (por ejemplo aminoglucósidos).
- 2) Sistemas de dos componentes, integrados por una proteína de la membrana interna y una proteína de fusión de membrana (MFP) (por ejemplo MexJK) (54), que permiten el transporte de tóxicos anfipáticos (por ejemplo triclosán).
- 3) Sistemas de tres componentes, integrados por una proteína de la membrana interna, una MFP y una porina (por ejemplo MexJK-OprM) (54), que son capaces de expulsar la mayoría de los tóxicos anfipáticos y lipófilos (por ejemplo eritromicina, tetraciclina, desoxicolato, quinolonas, etc.).

Sistemas YhiUV y MdtABC de *E. coli*

Recientemente se han caracterizado dos nuevos sistemas de bombeo de fármacos en *E. coli*: YhiUV (68) y MdtABC (*Multiple Drug Transport*) (42, 43). YhiUV confiere resistencia a desoxicolato, doxorubicina, rodamina, eritromicina, cristal violeta, benzalconio y SDS (72), y MdtABC a desoxicolato y novobiocina (42, 43).

Las proteínas YhiU y MdtA pertenecen a la familia MFP y YhiV, y MdtB y MdtC a la superfamilia RND. Se ha visto que MdtB y MdtC se disponen formando heteromultímeros con un rango de sustratos ampliado respecto al homomultímero MdtC (42).

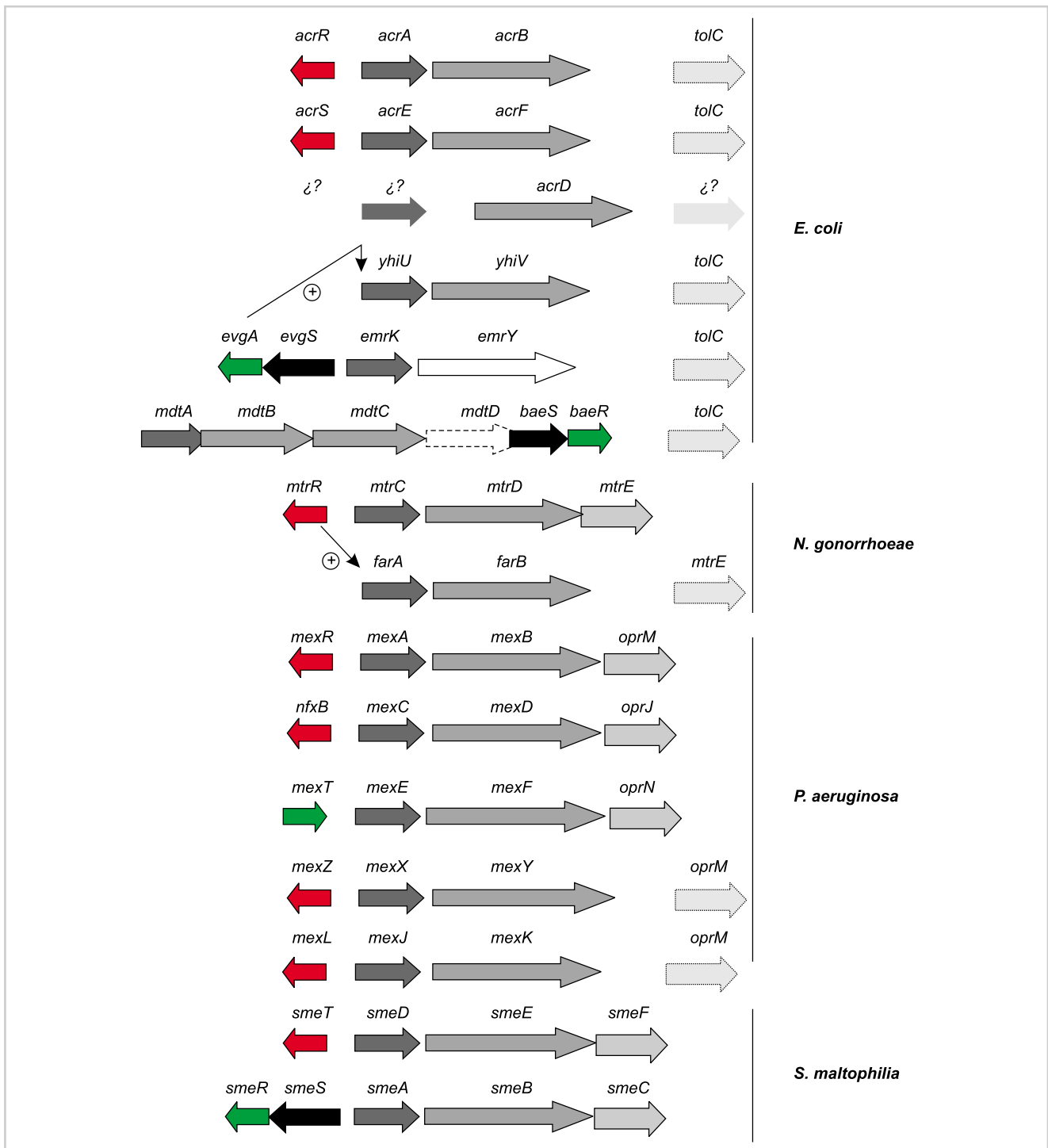


Figura 2. Organización génica de los sistemas de bombeo RND. En el esquema se muestran los genes de los reguladores y de los componentes estructurales de los sistemas de bombeo más representativos de los gramnegativos. Las proteínas pertenecientes a la misma familia de transportadores se representan con flechas del mismo tipo. Los reguladores, independientemente de la familia a que pertenezcan, se representan con flechas verdes (activadores) o rojas (represores). Con flechas negras se señalan las fosforilasas sensoras que forman parte de los sistemas de doble componente. Con el símbolo ⊕ se indica la activación ejercida a distancia por los reguladores *evgA* y *mtrR*. El gen *acrD* codifica un transportador RND de aminoglucósidos (48) de *E. coli*. Aunque aún no se ha demostrado, se cree que necesita asociarse a proteínas MFP y OMF para conferir resistencia a tóxicos hidrófobos (48, 54). El gen *mdtD*, con línea discontinua, codifica una proteína transportadora de la superfamilia MFS que, aunque forma parte del operón, no está implicada en el fenotipo de resistencia (42, 43). Aunque el gen *tolC* no forma parte de ninguno de estos operones, la porina TolC se asocia a los sistemas de bombeo AcrAB, AcrEF (69), EmrKY (EmrY es un transportador MFS), YhiUV (68) y MdtABC (42) de *E. coli*. El gen *mtrE* forma parte del operón *mtrCDE*; sin embargo, MtrE también se asocia al sistema de bombeo FarAB de *N. gonorrhoeae* (76). De igual forma, la porina OprM codificada por el operón *mexABoprM* de *P. aeruginosa* también se asocia a los sistemas de bombeo MexXY (53, 80) y MexJK (54).

Ambos sistemas se transcriben formando sendos operones (Fig. 2) y, al igual que AcrAB y AcrEF, son dependientes de la porina TolC (42, 68). Quizá lo más importante de estos sistemas de bombeo es que son los primeros sistemas RND descritos en *E. coli* que están regulados por un sistema de doble componente (42, 43, 68). Al igual que en el caso anterior, la regulación de estos sistemas se comentará más adelante.

Sistemas Mtr y Far de *N. gonorrhoeae*

En *N. gonorrhoeae* se han caracterizado dos sistemas RND: Mtr (*Multiple Transferable Resistance*) (74, 75) y Far (*Fatty Acid Resistance*) (76).

El sistema Mtr expulsa numerosos compuestos hidrófobos, entre los que se encuentran ciertos antimicrobianos (eritromicina, rifampicina y azitromicina), detergentes aniónicos, péptidos antimicrobianos, sales biliares y hormonas esteroideas (74). El sistema Far sólo confiere resistencia a ácidos grasos de cadena larga (oleico, linolénico y palmítico) (76).

Algunas de las sustancias que expulsan Mtr y Far (por ejemplo sales biliares, hormonas esteroideas, péptidos antimicrobianos y ácidos grasos de cadena larga) generalmente se encuentran en las mucosas que infecta este microorganismo. Por esta razón, ciertos autores consideran que estos sistemas de bombeo son factores de virulencia de *N. gonorrhoeae*, pues permiten la supervivencia de la bacteria y el establecimiento de la infección (71).

Los sistemas Mtr y Far están codificados en los operones *mtrCDE* (77) y *farAB* (76) (Fig. 2).

Los genes *mtrC* y *farA* (71) codifican proteínas de fusión de membrana (MFP), *mtrD* y *farB* transportadores de la superfamilia RND, y *mtrE* una proteína de membrana externa (OMF).

Estos dos sistemas se encuentran estrechamente relacionados y comparten tanto la porina MtrE como el regulador MtrR (71). Más adelante se comentarán algunos aspectos de la regulación de la expresión de MtrCDE y FarAB.

Sistemas Mex de *P. aeruginosa*

La secuenciación del genoma de *P. aeruginosa* ha puesto de manifiesto la existencia de genes que codifican hasta doce presuntos transportadores de la superfamilia RND (6). Por el momento, en este microorganismo se han caracterizado bioquímicamente cinco sistemas de multiresistencia (*Multidrug Efflux pump*): MexAB-OprM (50), MexCD-OprJ (51), MexEF-OprN (52), MexXY (53) y MexJK (54).

MexAB-OprM está implicado en resistencia intrínseca a diversos antibióticos (fluoroquinolonas, betalactámicos, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprima, sulfonamidas). También expulsa triclosán, solventes orgánicos, detergentes, inhibidores de la biosíntesis de ácidos grasos (70), una homoserín lactona (C12-HSL) autoinductora del sistema de *quorum sensing* (23, 24) y parece que también ciertos determinantes de virulencia (78). El grado de resistencia a los compuestos tóxicos que son sustrato de la bomba es mucho mayor en los mutantes (*nalB* y *nalC*) que sobreexpresan este sistema.

Los mutantes que sobreexpresan MexCD-OprJ (*nfxB*) son resistentes prácticamente a los mismos antibióticos que los mutantes *nalB* (fluoroquinolonas, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, tetraciclina, trimetoprima, betalactámicos y triclosán). Sin embargo, estos mutantes son hipersensibles a los betalactámicos carbenicilina y aztreonam y a los aminoglucósidos (70).

La sobreexpresión de MexEF-OprN (mutantes *nfxC*) confiere resistencia a fluoroquinolonas, cloranfenicol, trimetoprima, triclosán e imipenem (a este último por una disminución en la síntesis de la porina OprD) (52). Recientemente se ha visto que este sistema, al igual que MexAB-OprM, también expulsa autoinductores del sistema de señalización de *quorum sensing* (25). Estos mutantes, al igual que los *nfxB*, también son hipersensibles a los betalactámicos y los aminoglucósidos (70).

El sistema MexXY está implicado en resistencia intrínseca inducida por la presencia del sustrato (79) a aminoglucósidos, tetraciclina y eritromicina (80). Además, se han encontrado mutantes altamente resistentes a aminoglucósidos y fluoroquinolonas (70) que sobreexpresan este sistema.

La sobreexpresión del sistema MexJK confiere resistencia a triclosán, tetraciclina y eritromicina (54).

Como se ha mencionado antes, los mutantes *nfxB* y *nfxC* son hipersensibles a los aminoglucósidos y a los betalactámicos. En este sentido, se ha visto que la sobreexpresión de MexCD-OprJ (mutantes *nfxB*) tiene como consecuencia una disminución en la expresión de la betalactamasa AmpC y del sistema MexAB-OprM (70). Por otra parte, dado que la resistencia a los aminoglucósidos se debe en gran medida a MexXY (70), quizás su expresión también esté disminuida en dichos mutantes. Éste y otros datos (81) sugieren que la expresión de los sistemas MDR en *P. aeruginosa* debe estar coordinada de tal modo que en ningún momento se supere un flujo determinado.

La organización génica de todos los sistemas Mex de *P. aeruginosa* es similar (Fig. 2). Los genes *mexA*, *mexC*, *mexE*, *mexX* y *mexJ* codifican proteínas MFP; *mexB*, *mexD*, *mexF*, *mexY* y *mexK* transportadores RND; y *oprM*, *oprJ* y *oprN* proteínas OMF (50-54).

El sistema MexXY, que carece de porina propia, se asocia a OprM (53, 79, 80). Además, se ha demostrado que OprM también puede reemplazar a OprJ, y viceversa (82, 83), y a OprN (84). Incluso TolC (de *E. coli*) y SmeC (de *S. maltophilia*) pueden, respectivamente, acoplarse a MexCD y MexAB (56, 85). En cambio, la interacción de las proteínas codificadas en los dos primeros genes del operón es específica (70).

El sistema MexJK, recientemente descrito en *P. aeruginosa*, posee una característica que le distingue del resto de los sistemas RND caracterizados hasta el momento en este microorganismo, ya que, tal como se ha comentado anteriormente, MexJK puede acoplarse a la porina OprM (al igual que MexXY) o actuar como un sistema RND de sólo dos componentes (54), aunque se requiere la asociación MexJK-OprM para el transporte de tetraciclina y eritromicina. Sin embargo, la sobreexpresión de MexJK por sí sola parece ser suficiente para conferir resistencia a ciertas sustancias anfipáticas (por ejemplo triclosán) (54).

Corriente arriba del primer gen de cada uno de los operones se han identificado los genes reguladores locales: *mexR* (62), *nfxB* (86), *mexT* (67), *mexZ* (80) y *mexL* (54). Los genes *mexR*, *nfxB*, *mexZ* y *mexL* codifican represores transcripcionales y se localizan en la hebra complementaria a los genes del operón. El gen *mexT* codifica un activador transcripcional y se localiza en la misma hebra (67).

Recientemente se ha purificado (87) y cristalizado (88) el regulador MexR y se ha visto que se une en forma de dímeros a dos sitios de la región intergénica *mexR-mexA* (87). Esta secuencia operadora (*mexO*) (87) tiene homología con las repeticiones invertidas a las que se unen los dímeros del regulador de *E. coli* MarR (*marO*) en la región intergénica *marR-marA* (89). *marA* es el primer gen del operón *marAB* (*Multiple Antibiotic Resistance*) y codifica el activador global MarA. Sobre él volveremos a hablar posteriormente.

De todos los sistemas MDR caracterizados en *P. aeruginosa*, parece que MexAB-OprM es el único que se expresa de forma constitutiva (al menos en condiciones de laboratorio) en las cepas silvestres (70). Sin embargo, tanto *in vivo* (64, 90) como *in vitro* (51, 54, 62, 67, 79, 91), se han encontrado mutantes multirresistentes de *P. aeruginosa* que sobreexpresan alguno de los sistemas de bombeo antes descritos.

En otro apartado se comentarán algunos aspectos de la regulación de estos sistemas MDR.

Sistemas Sme de *S. maltophilia*

En *S. maltophilia* se han caracterizado hasta el momento dos sistemas RND implicados en multirresistencia a antibióticos: SmeDEF (55) y SmeABC (56).

Ambos sistemas Sme (*Stenotrophomonas Multidrug Efflux*) son diferentes tanto desde el punto de vista de la regulación como de la resistencia que confieren.

El sistema SmeDEF parece estar implicado tanto en resistencia intrínseca (92) como adquirida (55, 93, 94) a los antibióticos. En este sentido, se ha demostrado la sobreexpresión de este sistema de bombeo en aislamientos clínicos de *S. maltophilia* resistentes a los antibióticos (94).

SmeDEF confiere resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, quinolonas, macrólidos y novobiocina. Sin embargo, no confiere resistencia a los aminoglucósidos (kanamicina, amikacina, gentamicina, estreptomycin, tobramicina), lo que indica que esta familia de antibióticos no es sustrato de la bomba (92, 93).

El sistema SmeABC, a diferencia del anterior, no se expresa en las cepas silvestres, por lo que no parece estar implicado en resistencia intrínseca (92). En cambio, la sobreexpresión de la proteína SmeC es capaz de conferir un fenotipo de multirresistencia a aminoglucósidos, quinolonas y betalactámicos. Sin embargo, la resistencia a betalactámicos en estos mutantes, más que a un incremento en el transporte del antibiótico parece deberse a una sobreexpresión concomitante de betalactamasas (56). Por otra parte, aunque en estos mutantes multirresistentes se sobreexpresan los tres genes del operón, la delección de los genes *smeA* y *smeB* (a diferencia de la de *smeC*) no parece tener ningún efecto sobre el fenotipo de multirresistencia (56).

Siguiendo la norma general de este tipo de transportadores, *smeDEF* y *smeABC* se transcriben formando operones (55, 56) (Fig. 2) en los cuales el primer gen, *smeD/smeA*, codifica una proteína de fusión de membrana (MFP), *smeE/smeB* codifica un transportador de la superfamilia RND y *smeF/smeC* una proteína de la membrana externa (OMF).

Por otra parte, se ha visto que *smeC* puede transcribirse a partir de su propio promotor, y que además es capaz de reemplazar funcionalmente a OprM en un mutante *nalB* Δ *oprM* de *P. aeruginosa* (56). Este dato, junto con el hecho de que la inactivación de *smeA* y *smeB* no afecta a la resistencia a los antimicrobianos, indica que SmeC debe acoplarse a otro sistema RND para conferir el fenotipo de multirresistencia (56).

Los genes que regulan la expresión de SmeDEF y SmeABC se localizan corriente arriba y en la hebra complementaria de los genes del operón. En el caso de SmeDEF se ha identificado un gen, *smeT*, que codifica el regulador transcripcional del sistema de bombeo (95). Se han identificado mutaciones en este regulador SmeT en mutantes multirresistentes, clínicos y de laboratorio, que sobreexpresan SmeDEF (96, 97).

La expresión de SmeABC está regulada positivamente por el sistema de doble componente SmeSR. El gen *smeS* codifica para una fosforilasa sensora y el gen *smeR* para un regulador de respuesta (56). Este tipo de regulación se comentará brevemente en otro apartado.

Regulación de la expresión de los sistemas RND en gramnegativos

La regulación de la expresión de sistemas de bombeo ha de ser muy fina para evitar los posibles efectos negativos que una desregulación podría tener sobre la fisiología bacteriana. Por esta razón, además de estar sometidos a una regulación local (activadora o represora) por proteínas codificadas en genes adyacentes a los del sistema de bombeo, su expresión debe estar controlada por otros factores. Es lógico pensar que se activen en presencia de su sustrato natural, pero se desconoce la función real de la mayoría de estos transportadores y, aunque se ha visto que son capaces de expulsar una amplia variedad de compuestos, de momento no se han identificado los sustratos naturales en la mayoría de los casos. Por otra parte, cada vez se están encontrando más ejemplos de regulación de sistemas MDR mediada por factores de transcripción globales (66).

A continuación se describen los mecanismos que regulan la expresión de estos sistemas.

Regulación por medio de un represor local

Por lo general, la expresión de este tipo de sistemas se encuentra reprimida por el producto de un gen regulador localizado corriente arriba del primer gen del operón y en la hebra complementaria. Este tipo de regulación es el mejor estudiado. En la mayoría de los casos, el producto del gen represor puede unirse a la región intergénica reprimiendo la transcripción tanto de los genes del operón como la suya propia. En ocasiones esta represión no es total, sino que permite una expresión basal del sistema de bombeo relacionada con resistencia intrínseca a los antimicrobianos (95, 98, 99).

Están regulados por la acción de un represor local (Fig. 2) los sistemas AcrAB (59) y AcrEF (73) de *E. coli*, MtrCDE de *N. gonorrhoeae* (70), MexAB-OprM (87), MexCD-OprJ (51, 100), MexXY (80) y MexJK (54) de *P. aeruginosa*, y SmeDEF de *S. maltophilia* (95, 96).

Generalmente, la aparición de fenotipos de multiresistencia está asociada a la presencia de mutaciones en los genes reguladores locales o en sus regiones promotoras. Así, se han encontrado mutaciones en los reguladores *acrR*

y *acrS* (101), *mtrR* (60, 61), *mexR* (mutantes *nalB*) (64, 65), *nfxB* (51, 86), *mexL* (54) y *smeT* (95-97).

Sin embargo, la regulación de estos sistemas no es tan simple como parece. Citaremos algunos ejemplos:

- Se ha observado que *Neisseria meningitidis*, al igual que *N. gonorrhoeae*, contiene el operón *mtrCDE* (71). En numerosos aislamientos clínicos que no sobreexpresan el sistema de bombeo se han encontrado mutaciones sin sentido en el gen regulador *mtrR* que deberían originar un fenotipo de multiresistencia (71). Esto no ocurre debido a la existencia de una inserción de 154-159 pb (102) en el promotor de *mtrR* que reprime la transcripción del operón (71). De este modo, la expresión de MtrCDE se encuentra reprimida aunque el represor local sea afuncional.
- Por otra parte, se han encontrado mutantes de *P. aeruginosa* que sobreexpresan el sistema de bombeo MexAB-OprM, pero que no llevan mutaciones ni en el gen *mexR* ni en su región promotora. A estos mutantes se les ha denominado *nalC* (103).
- También en *P. aeruginosa* se ha demostrado que la delección del regulador *mexZ*, aunque lleva consigo la sobreexpresión del sistema MexXY, no confiere por sí sola un fenotipo de multiresistencia (70).

Regulación por medio de un activador local

Hasta el momento sólo se ha identificado este tipo de regulación en el sistema MexEF-OprN de *P. aeruginosa*. El activador local, denominado *mexT* (67), se localiza en la misma hebra y corriente arriba de los genes del operón (Fig. 2).

El sistema MexEF-OprN no se expresa en condiciones normales de laboratorio. Sin embargo, tanto *in vivo* (104) como *in vitro* (67) se han aislado mutantes *nfxC* que sobreexpresan este sistema.

Se han descrito tres tipos de genes *mexT* silvestres (105) que a su vez originan tres tipos de mutantes *nfxC*: tipo I, tipo II y tipo III.

En los mutantes *nfxC* tipo I, la sobreexpresión del sistema MexEF-OprN tiene lugar como consecuencia de la aparición de mutaciones en el gen *mexT* silvestre (inactivo), que permiten que se sintetice una proteína MexT activadora.

En los mutantes *nfxC* tipo II, el gen silvestre codifica una proteína inactiva como consecuencia de la presencia de una inserción de ocho pares de bases en el gen *mexT*. La forma activa de la proteína MexT se obtiene por la delección de estos ocho pares de bases.

En los mutantes *nfxC* tipo III no se ha hallado ninguna diferencia entre las secuencias de los genes *mexT* silvestre y multirresistente. Por lo tanto, debe haber otro gen regulador además de *mexT*. Se ha propuesto la existencia de un presunto gen supresor (*mexS*) (105) como diana de estos mutantes *nfxC* tipo III.

Según esta hipótesis, en los mutantes tipo I y tipo II el gen supresor *mexS* estaría inactivo (105), de modo que para reprimir la expresión del operón también sería necesario inactivar el gen *mexT*. Esta inactivación tendría lugar mediante la adquisición de mutaciones concretas en el caso del tipo I e inserciones de ocho pares de bases en el del tipo II.

Por lo tanto, la sobreexpresión de MexEF-OprN en los mutantes *nfxC* tipo I y tipo II sólo sería posible si revirtieran las mutaciones que inactivaron previamente el gen *mexT*. En cambio, en los mutantes tipo III, dado que el gen *mexT* no está mutado, la aparición de mutaciones en el presunto gen *mexS* permitiría la sobreexpresión de MexEF-OprN.

La frecuencia relativa de aparición de cada uno de los tres tipos de mutantes *nfxC* parece apoyar esta hipótesis (105).

Por otra parte, MexT reprime la expresión de la porina OprD tanto transcripcional como postranscripcional (67). OprD es una proteína de membrana externa que facilita la entrada por difusión de aminoácidos básicos, pequeños péptidos y antimicrobianos tipo carbapenemes (70). Esta represión de la expresión de OprD hace que los mutantes *nfxC*, además de ser resistentes a los compuestos expulsados por el sistema MexEF-OprN (52), lo sean también al imipenem (91).

Recientemente se ha demostrado que el represor local (MtrR) del sistema MtrCDE de *N. gonorrhoeae* también actúa como activador del sistema de multirresistencia RND FarAB (71). Sin embargo, dada la distancia existente entre los genes *mtrR* y *farA* quizás no sería correcto hablar de activación local.

Activación por medio de un sistema de doble componente

En las bacterias, los sistemas de transducción de señales de doble componente están integrados por una fosforilasa (por ejemplo VanS, BaeS), que recibe los estímulos activadores, y un regulador de respuesta (por ejemplo VanR, BaeR), que se activa mediante fosforilación (106).

Se sabía que la resistencia a la vancomicina en los microorganismos grampositivos *Enterococcus* spp. y *S. pneumoniae* está regulada por un sistema de doble componente (*vanSR*) (107, 108). Recientemente también se ha identificado este tipo de regulación en los sistemas de bombeo

múltiple de fármacos NorA de *S. aureus* (109), YhiUV, EmrKY (68) y MdtABC (42, 43) de *E. coli*, y SmeABC de *S. maltophilia* (56).

Hasta el momento, en gramnegativos se han caracterizado tres sistemas de regulación de doble componente implicados en multirresistencia: EvgSA y BaeSR en *E. coli* y SmeSR en *S. maltophilia*.

EvgA (regulador de respuesta) activa la expresión de los sistemas EmrKY y YhiUV (68). El operón *emrKY* se localiza corriente abajo y en la hebra complementaria del operón regulador *evgSA*. En cambio, en el caso del operón *yhiUV*, la activación se ejerce a distancia (Fig. 2). Sobre este regulador volveremos más adelante.

BaeR activa la expresión de MdtABCD (42, 43) y de otros genes de función desconocida (43). A diferencia del caso anterior, los operones *baeSR* (regulador) y *mdtABCD* se localizan uno a continuación del otro (Fig. 2) y se transcriben de forma convergente.

SmeR activa la expresión de los operones *smeABC* y *smeSR* (autoactivación). Por homología con otros reguladores, se cree que es posible que SmeR también active el gen de la betalactamasa L2 (55). El operón regulador *smeSR* se localiza corriente arriba y en la cadena complementaria del operón que codifica el sistema de bombeo (Fig. 2).

Aunque se han encontrado mutantes MDR que sobreexpresan estos sistemas, no se han hallado mutaciones en ninguno de estos reguladores que justifiquen dicha sobreexpresión. Por lo tanto, la posible mutación debe encontrarse en algún otro regulador de la cascada de activación.

Reguladores globales

Como se dijo al comienzo de esta sección, la expresión de los sistemas MDR ha de estar perfectamente regulada. La desregulación de estos sistemas podría ser nefasta para la célula de forma directa, como consecuencia de la alteración de la integridad de la membrana (por la presencia de una cantidad excesiva de porinas), e indirecta, por un lado como consecuencia del gasto energético que comporta la sobreexpresión de sistemas de transporte activo y por otro por la expulsión de metabolitos esenciales para la célula.

Todos estos sistemas se encuentran regulados localmente por proteínas codificadas en genes adyacentes al operón (en los apartados anteriores se han presentado algunos ejemplos de la regulación local de sistemas MDR). Sin embargo, datos recientes indican que muchos de estos sistemas también se encuentran regulados globalmente (66).

Estos reguladores globales se activan en general en situaciones de estrés bacteriano (por ejemplo entrada en fa-

se estacionaria, choque osmótico, choque térmico, cambio de pH, estrés oxidativo, etc.) e inducen la expresión de numerosos genes, entre ellos algunos que codifican la síntesis de sistemas de transporte múltiple de fármacos. En este sentido, se ha descrito que el activador global de *E. coli* MarA (codificado por el gen *marA*) activa la expresión de al menos sesenta genes (110). Entre los genes activados por MarA se encuentran los del operón *acrAB* (59, 110). Sin embargo, la activación de AcrAB en respuesta al estrés general es independiente de los reguladores globales MarA y SoxS (y también del regulador local AcrR) (59). Por el momento se desconoce qué regulador global está implicado en esta activación de AcrAB en respuesta al estrés, pero se cree que puede ser algún homólogo (o varios) de los anteriores (59).

El gen *marA* forma parte del operón *marAB*, que junto con los genes *marR* y *marC* constituyen el locus regulador *mar* (*Multiple Antibiotic Resistance*) (111). Los genes *marC* y *marB* codifican proteínas de función desconocida, y *marR* codifica el represor local del operón (MarR) (111). Además de la inducción fisiológica de AcrAB mediada por MarA, se ha visto que mutaciones en el gen represor de *marA* (*marR*) originan un fenotipo de multiresistencia en *E. coli* asociado a la sobreexpresión del sistema AcrAB-TolC (66) en ausencia de mutaciones en AcrR. Este hecho demuestra que la función del regulador local de AcrAB (AcrR) es modular la activación de la expresión del sistema de bombeo mediada por reguladores globales (59).

Además de MarA se han identificado otros tres reguladores globales de *E. coli* implicados en la activación de AcrAB: SoxS, Rob (59) y SdiA (112). SoxS y Rob activan la expresión del operón *AcrAB*, tanto de forma directa como mediada por MarA (59). En cuanto a SdiA, no está claro su mecanismo de acción. Se ha visto que en mutantes con delección del sistema AcrAB también induce resistencia a ciertos antimicrobianos (112). Se han propuesto dos posibilidades: que además de activar la expresión de AcrAB active también la de otros sistemas MDR, o que, de un modo similar al regulador BmrR de *B. subtilis*, actúe secuestrando antimicrobianos (112).

Por otra parte, pese a que en un principio se pensó que EvgA (regulador de respuesta del sistema de doble componente EvgSA) (Fig. 2) era el regulador específico de los sistemas de bombeo EmrKY y YhiUV de *E. coli* (68), recientemente se ha visto que EvgA es en realidad un regulador global de respuesta que induce la expresión de al menos 37 genes en este microorganismo (113). Entre los genes activados por EvgA figuran algunos relacionados con resistencia a ácidos y con expulsión activa de antimicrobianos, y 21 genes de función desconocida (113).

La regulación de sistemas de multiresistencia por medio de reguladores globales se ha descrito también en otros microorganismos:

- En *B. subtilis* se ha demostrado que el activador global Mta activa la expresión de Bmr y Blt (114), dos sistemas de multiresistencia de *B. subtilis* homólogos a NorA (115).
- En *S. aureus*, la expresión del sistema de multiresistencia MFS NorA parece estar regulada por una presunta proteína de 18 kD. La unión de esta proteína de 18 kD al promotor de *norA* parece ser dependiente del sistema de regulación global de doble componente ArlRS (109).
- En *N. gonorrhoeae* se ha descrito que el regulador global MtrA es necesario para que el sustrato TritónX-103 active la transcripción (independiente de MtrR) del operón *mtrCDE*. De momento se desconoce si este efecto tiene lugar por la activación directa de MtrCDE (71).
- En *P. aeruginosa*, tanto la inducción del sistema MexAB-OprM en fase estacionaria (21, 22) como la aparición de mutantes *nalC* (103) sugieren que la regulación de este sistema, al igual que en los casos descritos, también debe obedecer a reguladores globales. En este sentido, se ha observado la existencia de un regulador global (MvaT) (116) implicado en la regulación por fase de crecimiento de la expresión de una serie de genes controlados por *quorum sensing*. Se ha visto que MvaT impide que estos genes se expresen en fase exponencial de crecimiento, previniendo de este modo una posible activación temprana de su expresión que podría tener lugar, por ejemplo, como consecuencia de una cantidad anormalmente alta de autoinductor (116).

De todos estos datos se puede deducir que, probablemente, los reguladores locales de los sistemas MDR son los encargados de modular la acción ejercida por los reguladores globales (66).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado en el Dpto. de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología (CSIC) bajo la dirección del Dr. José Luis Martínez. Para su realización, la autora ha disfrutado de una beca predoctoral FPU del MECyD. El trabajo efectuado en el laboratorio del Dr. Martínez está financiado con los proyectos QLRT-2000-01339, BIO2001-1081, CAM 08.2/0020.1/2001 y QLRT-2000-00873.

BIBLIOGRAFÍA

1. Nikaido, H. *Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux*. Science 1994; 264: 382-388.

2. Bradshaw, D.M., Arceci, R.J. *Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance*. J Clin Oncol 1998; 16: 3674-3690.
3. Rouch, D.A., Cram, D.S., DiBerardino, D., Littlejohn, T.G., Skurray, R.A. *Efflux-mediated antiseptic resistance gene qacA from Staphylococcus aureus: Common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins*. Mol Microbiol 1990; 4: 2051-2062.
4. Lomovskaya, O., Lewis, K. *Emr, an Escherichia coli locus for multidrug resistance*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 8938-8942.
5. Paulsen, I.T., Nguyen, L., Sliwinski, M.K., Rabus, R., Saier, M.H.J. *Microbial genome analyses: Comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes*. J Mol Biol 2000; 301: 75-100.
6. Stover, C.K., Pham, X.Q., Erwin, A.L. y cols. *Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PA01, an opportunistic pathogen*. Nature 2000; 406: 959-964.
7. Paulsen, I.T., Brown, M.H., Littlejohn, T.G., Mitchell, B.A., Skurray, R.A. *Multidrug resistance proteins QacA and QacB from Staphylococcus aureus: Membrane topology and identification of residues involved in substrate specificity*. Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 3630-3635.
8. Edgar, R., Bibi, E. *A single membrane-embedded negative charge is critical for recognizing positively charged drugs by the Escherichia coli multidrug resistance protein MdfA*. Embo J 1999; 18: 822-832.
9. Schuldiner, S., Granot, D., Steiner, S. y cols. *Precious things come in little packages*. J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3: 155-162.
10. Brown, M.H., Skurray, R.A. *Staphylococcal multidrug efflux protein QacA*. J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3: 163-170.
11. Guan, L., Nakae, T. *Identification of essential charged residues in transmembrane segments of the multidrug transporter MexB of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2001; 183: 1734-1739.
12. Mazurkiewicz, P., Konings, W.N., Poelarends, G.J. *Acidic residues in the lactococcal multidrug efflux pump LmrP play critical roles in transport of lipophilic cationic compounds*. J Biol Chem 2002; 277: 26081-26088.
13. Aires, J.R., Köhler, T., Nikaido, H., Plesiat, P. *Involvement of an active efflux system in the natural resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2624-2628.
14. Zgurskaya, H.I., Nikaido, H. *AcrA is a highly asymmetric protein capable of spanning the periplasm*. J Mol Biol 1999; 285: 409-420.
15. Zgurskaya, H.I., Nikaido, H. *Bypassing the periplasm: Reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of Escherichia coli*. Proc Nat Acad Sci USA 1999; 96: 7190-7195.
16. Zgurskaya, H.I., Nikaido, H. *Multidrug resistance mechanisms: Drug efflux across two membranes*. Mol Microbiol 2000; 37: 219-225.
17. Tikhonova, E.B., Wang, Q., Zgurskaya, H.I. *Chimeric analysis of the multicomponent multidrug efflux transporters from gram-negative bacteria*. J Bacteriol 2002; 184: 6499-6507.
18. Maseda, H., Kitao, M., Eda, S., Yoshihara, E., Nakae, T. *A novel assembly process of the multicomponent xenobiotic efflux pump in Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 2002; 46: 677-686.
19. Mao, W., Warren, M.S., Black, D.S. y cols. *On the mechanism of substrate specificity by resistance nodulation division (RND)-type multidrug resistance pumps: The large periplasmic loops of MexD from Pseudomonas aeruginosa are involved in substrate recognition*. Mol Microbiol 2002; 46: 889-901.
20. Thanassi, D.G., Cheng, L.W., Nikaido, H. *Active efflux of bile salts by Escherichia coli*. J Bacteriol 1997; 179: 2512-2518.
21. Evans, K., Poole, K. *The MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa is growth-phase regulated*. FEMS Microbiol Lett 1999; 173: 35-39.
22. Sánchez, P., Rojo, F., Martínez, J.L. *Transcriptional regulation of mexR, the repressor of Pseudomonas aeruginosa mexAB-oprM multidrug efflux pump*. FEMS Microbiol Lett 2002, 207: 63-68.
23. Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezon, J., Poole, K. *Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1998; 180: 5443-5447.
24. Pearson, J.P., Van Delden, C., Iglewski, B.H. *Active efflux and diffusion are involved in transport of Pseudomonas aeruginosa cell-to-cell signals*. J Bacteriol 1999; 181: 1203-1210.
25. Köhler, T., van Delden, C., Curty, L.K., Hamzehpour, M.M., Pechere, J.C. *Overexpression of the MexEF-OprN multidrug efflux system affects cell-to-cell signaling in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2001; 183: 5213-5222.
26. Pesci, E.C., Milbank, J.B.J., Pearson, J.P. *Quinolone signaling in the cell-to-cell communication system of Pseudomonas aeruginosa*. Proc Nat Acad Sci USA 1999; 96: 11229-11234.
27. Poole, K. *Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-negative bacteria*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2233-2241.
28. Poole, K. *Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in Gram-positive bacteria and the mycobacteria*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2595-2599.
29. Markham, P.N., Neyfakh, A.A. *Inhibition of the multidrug transporter NorA prevents emergence of norfloxacin resistance in Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2673-2674.
30. Markham, P.N. *Inhibition of the emergence of ciprofloxacin resistance in Streptococcus pneumoniae by the multidrug efflux inhibitor reserpine*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 988-989.
31. Markham, P.N., Westhaus, E., Klyachko, K., Johnson, M.E., Neyfakh, A.A. *Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2404-2408.
32. Lomovskaya, O., Warren, M.S., Lee, A. y cols. *Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa: Novel agents for combination therapy*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 105-116.
33. Ribera, A., Ruiz, J., Jiménez de Anta, M.T., Vila, J. *Effect of an efflux pump inhibitor on the MIC of nalidixic acid for Acinetobacter baumannii and Stenotrophomonas maltophilia clinical isolates*. J Antimicrob Chemother 2002b; 49: 697-U10.
34. Saurin, W., Hofnung, M., Dassa, E. *Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters*. J Mol Evol 1999; 48: 22-41.
35. Pao, S.S., Paulsen, I.T., Saier, M.H.J. *Major facilitator superfamily*. Microbiol Mol Biol Rev 1998; 62: 1-34.
36. Tseng, T.T., Gratwick, K.S., Kollman, J. y cols. *The RND permease superfamily: An ancient, ubiquitous and diverse family that includes human disease and development proteins*. J Mol Microbiol Biotechnol 1999; 1: 107-125.
37. Brown, M.H., Paulsen, I.T., Skurray, R.A. *The multidrug efflux protein NorM is a prototype of a new family of transporters*. Mol Microbiol 1999; 31: 394-395.
38. van Veen, H.W., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, W.N., Higgins, C.F. *A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene*. Nature 1998; 391: 291-295.

39. Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., Konno, M. *Nucleotide sequence and characterization of the Staphylococcus aureus norA gene, which confers resistance to quinolones.* J Bacteriol 1990; 172: 6942-6949.
40. Waters, S.H., Rogowsky, P., Grinsted, J., Altenbuchner, J., Schmitt, R. *The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: Nucleotide sequence analysis.* Nucleic Acids Res 1983; 11: 6089-6105.
41. Edgar, R., Bibi, E. *MdfA, an Escherichia coli multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition.* J Bacteriol 1997; 179: 2274-2280.
42. Nagakubo, S., Nishino, K., Hirata, T., Yamaguchi, A. *The putative response regulator BaeR stimulates multidrug resistance of Escherichia coli via a novel multidrug exporter system, MdtABC.* J Bacteriol 2002; 184: 4161-7.
43. Baranova, N., Nikaido, H. *The BaeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in Escherichia coli and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate.* J Bacteriol 2002; 184: 4168-4176.
44. Bolhuis, H., Poelarends, G., van Veen, H.W., Poolman, B., Driessen, A.J., Konings, W.N. *The Lactococcal lmrP gene encodes a proton motive force-dependent drug transporter.* J Biol Chem 1995; 270: 26092-26098.
45. Neyfakh, A.A., Bidnenko, V.E., Chen, L.B. *Efflux-mediated multidrug resistance in Bacillus subtilis: Similarities and dissimilarities with the mammalian system.* Proc Natl Acad Sci USA 1991 88: 4781-4785.
46. Dinh, T., Paulsen, I.T., Saier, M.H.J. *A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of Gram-negative bacteria.* J Bacteriol 1994; 176: 3825-3831.
47. Ma, D., Cook, D.N., Alberti, M., Pon, N.G., Nikaido, H., Hearst, J.E. *Molecular cloning and characterization of acrA and acrE genes of Escherichia coli.* J Bacteriol 1993; 175: 6299-6313.
48. Rosenberg, E.Y., Ma, D., Nikaido, H. *AcrD of Escherichia coli is an aminoglycoside efflux pump.* J Bacteriol 2000; 182: 1754-1756.
49. Hagman, K.E., Lucas, C.E., Balthazar, J.T. y cols. *The MtrD protein of Neisseria gonorrhoeae is a member of the resistance/nodulation/division protein family constituting part of an efflux system.* Microbiology UK 1997; 143: 2117-2125.
50. Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J., Nishino, T. *The outer membrane protein OprM of Pseudomonas aeruginosa is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon.* Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 2567-2569.
51. Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H. y cols. *Overexpression of the mexC-mexD-oprJ efflux operon in nfxB-type multidrug-resistant strains of Pseudomonas aeruginosa.* Mol Microbiol 1996, 21: 713-24.
52. Köhler, T., MicheaHamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L.K., Pechere, J.C. *Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa.* Mol Microbiol 1997, 23: 345-354.
53. Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., Tsuchiya, T. *Expression in Escherichia coli of a new multidrug efflux pump, MexXY, from Pseudomonas aeruginosa.* Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 415-417.
54. Chuanchuen, R., Narasaki, C.T., Schweizer, H.P. *The MexJK efflux pump of Pseudomonas aeruginosa requires OprM for antibiotic efflux but not for efflux of triclosan.* J Bacteriol 2002; 184: 5036-5044.
55. Alonso, A., Martínez, J.L. *Cloning and characterization of SmeDEF, a novel multidrug efflux pump from Stenotrophomonas maltophilia.* Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 3079-3086.
56. Li, X.Z., Zhang, L., Poole, K. *SmeC, an outer membrane multidrug efflux protein of Stenotrophomonas maltophilia.* Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 333-343.
57. Morita, Y., Kataoka, A., Shiota, S., Mizushima, T., Tsuchiya, T. *NorM of Vibrio parahaemolyticus is an Na(+)-driven multidrug efflux pump.* J Bacteriol 182: 6694-6697.
58. Morita, Y., Kodama, K., Shiota, S. y cols. *NorM, a putative multidrug efflux protein, of Vibrio parahaemolyticus and its homolog in Escherichia coli.* Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 1778-1782.
59. Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., Hearst, J.E. *The local repressor AcrR plays a modulating role in the regulation of acrAB genes of Escherichia coli by global stress signals.* Mol Microbiol 1996; 19: 101-12.
60. Shafer, W.M., Balthazar, J.T., Hagman, K.E., Morse, S.A. *Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of Neisseria gonorrhoeae that are resistant to faecal lipids.* Microbiology 1995; 141: 907-911.
61. Lucas, C.E., Balthazar, J.T., Hagman, K.E., Shafer, W.M. *The MtrR repressor binds the DNA sequence between the mtrR and mtrC genes of Neisseria gonorrhoeae.* J Bacteriol 1997; 179: 4123-4128.
62. Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q.X., Neshat, S., Heinrichs, D.E., Bianco, N. *Expression of the multidrug resistance operon mexA-mexB-oprM in Pseudomonas aeruginosa: MexR encodes a regulator of operon expression.* Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 2021-2028.
63. Saito, K., Yoneyama, H., Nakae, T. *nalB-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the mexR gene of the Pseudomonas aeruginosa chromosome.* FEMS Microbiol Lett 1999; 179: 67-72.
64. Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J.C., 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: 287-291.
65. Adewoye, L., Sutherland, A., Srikumar, R., Poole, K. *The MexR repressor of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in Pseudomonas aeruginosa: Characterization of mutations compromising activity.* J Bacteriol 2002; 184: 4308-4312.
66. Grkovic, S., Brown, M.H., Skurray, R.A. *Transcriptional regulation of multidrug efflux pumps in bacteria.* Semin Cell Dev Biol 2001; 12: 225-237.
67. Köhler, T., Epp, S.F., Curty, L.K., Pechere, J.C. *Characterization of MexT, the regulator of the MexE-MexF-OprN multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa.* J Bacteriol 1999; 181: 6300-6305
68. Nishino, K., Yamaguchi, A. *EvgA of the two-component signal transduction system modulates production of the YhiUV multidrug transporter in Escherichia coli.* J Bacteriol 2002; 184: 2319-2323.
69. Fralick, J.A. *Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of Escherichia coli.* J Bacteriol 1996; 178: 5803-5805.
70. Poole, K. *Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in Pseudomonas aeruginosa and related organisms.* J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3: 255-264.
71. Shafer, W.M., Veal, W.L., Lee, E.H., Zarantonelli, L., Balthazar, J.T., Rouquette, C. *Genetic organization and regulation of antimicrobial efflux systems possessed by Neisseria gonorrhoeae and Neisseria meningitidis.* J Mol Microbiol Biotechnol 2001; 3: 219-224.
72. Nishino, K., Yamaguchi, A. *Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in Escherichia coli.* J Bacteriol 2001; 183: 5803-5812.

73. Ma, D., Cook, D.N., Hearst, J.E., Nikaido, H. *Efflux pumps and drug resistance in Gram-negative bacteria*. Trends Microbiol 1994; 2: 489-493.
74. Hagman, K.E., Pan, W., Spratt, B.G., Balthazar, J.T., Judd, R.C., Shafer, W.M. *Resistance of Neisseria gonorrhoeae to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system*. Microbiology 1995; 141: 611-622.
75. Lucas, C.E., Hagman, K.E., Levin, J.C., Stein, D.C., Shafer, W.M. *Importance of lipooligosaccharide structure in determining gonococcal resistance to hydrophobic antimicrobial agents resulting from the mtr efflux system*. Mol Microbiol 1995; 16: 1001-1009.
76. Lee, E.H., Shafer, W.M. *The farAB-encoded efflux pump mediates resistance of gonococci to long-chained antibacterial fatty acids*. Mol Microbiol 1999; 33: 839-845.
77. Hagman, K.E., Shafer, W.M. *Transcriptional control of the mtr efflux system of Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 1995; 177: 4162-4165.
78. Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K. y cols. *Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of Pseudomonas aeruginosa*. J Exp Med 2002; 196: 109-118.
79. Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Nishino, T. *Contribution of the MexX-MexY-OprM efflux system to intrinsic resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2242-2246.
80. Aires, J.R., Köhler, T., Nikaido, H., Plesiat, P. *Involvement of an active efflux system in the natural resistance of Pseudomonas aeruginosa to aminoglycosides*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43: 2624-2628.
81. Li, X.Z., Barre, N., Poole, K. *Influence of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system on expression of the MexC-MexD-OprJ and MexE-MexF-OprN multidrug efflux systems in Pseudomonas aeruginosa*. J Antimicrob Chemother 2000; 46: 885-893.
82. Srikumar, R., Li, X.Z., Poole, K. *Inner membrane efflux components are responsible for beta-lactam specificity of multidrug efflux pumps in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 1997; 179: 7875-7881.
83. Gotoh, N., Tsujimoto, H., Nomura, A., Okamoto, K., Tsuda, M., Nishino, T. *Functional replacement of OprJ by OprM in the MexCD-OprJ multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 1998; 165: 21-27.
84. Maseda, H., Yoneyama, H., Nakae, T. *Assignment of the substrate-selective subunits of the MexEF-OprN multidrug efflux pump of Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 658-664.
85. Srikumar, R., Kon, T., Gotoh, N., Poole, K. *Expression of Pseudomonas aeruginosa multidrug efflux pumps MexA-MexB-OprM and MexC-MexD-OprJ in a multidrug-sensitive Escherichia coli strain*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42: 65-71.
86. Okazaki, T., Hirai, K. *Cloning and nucleotide sequence of the Pseudomonas aeruginosa nfxB gene, conferring resistance to new quinolones*. FEMS Microbiol Lett 1992; 76: 197-202.
87. Evans, K., Adewoye, L., Poole, K. *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 2001; 183: 807-812.
88. Lim, D., Poole, K., Strynadka, N.C. *Crystal structure of the MexR repressor of the mexRAB-oprM multidrug efflux operon of Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem 2002; 277: 29253-29259.
89. Martin, R.G., Rosner, J.L. *Binding of purified multiple antibiotic-resistance repressor protein (MarR) to mar operator sequences*. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92: 5456-5460.
90. Jalal, S., Ciofu, O., Høiby, N., Gotoh, N., Wretling, B. *Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in Pseudomonas aeruginosa isolates from cystic fibrosis patients*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 710-712.
91. Masuda, N., Sakagawa, E., Ohya, S. *Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 645-649.
92. Zhang, L., Li, X.Z., Poole, K. *SmeDEF multidrug efflux pump contributes to intrinsic multidrug resistance in Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 3497-503.
93. Alonso, A., Martínez, J.L. *Multiple antibiotic resistance in Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1140-1142.
94. Alonso, A., Martínez, J.L. *Expression of multidrug efflux pump SmeDEF by clinical isolates of Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1879-1881.
95. Sánchez, P., Alonso, A., Martínez, J.L. *Cloning and characterization of SmeT, a repressor of the Stenotrophomonas maltophilia multidrug efflux pump SmeDEF*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46: 3386-3393.
96. Alonso, A. *Bases moleculares de la resistencia múltiple a antibióticos de Stenotrophomonas maltophilia*. Tesis doctoral, Dpto. de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid 2000.
97. Sánchez-Díaz, P. *Coste y regulación de la resistencia múltiple a los antibióticos*. Tesis doctoral, Dpto. de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid 2002.
98. Li, X.Z., Nikaido, H., Poole, K. *Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39: 1948-1953.
99. Li, X.Z., Zhang, L., Poole, K. *Role of the multidrug efflux systems of Pseudomonas aeruginosa in organic solvent tolerance*. J Bacteriol 1998; 180: 2987-2991.
100. Shiba, T., Ishiguro, K., Takemoto, N., Koibuchi, H., Sugimoto, K. *Purification and characterization of the Pseudomonas aeruginosa NfxB protein, the negative regulator of the nfxB gene*. J Bacteriol 1995; 177: 5872-5877.
101. JellenRitter, A.S., Kern, W.V. *Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in Escherichia coli mutants selected with a fluoroquinolone*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 1467-1472.
102. Correia, F.F., Inouye, S., Inouye, M. *A family of small repeated elements with some transposon-like properties in the genome of Neisseria gonorrhoeae*. J Biol Chem 1988; 263: 12194-12198.
103. Srikumar, R., Paul, C.J., Poole, K. *Influence of mutations in the mexR repressor gene on expression of the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system of Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol 2000; 182: 1410-1414.
104. Pumbwe, L., Piddock, L.J.V. *Two efflux systems expressed simultaneously in multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 2861-2864.
105. Maseda, H., Saito, K., Nakajima, A., Nakae, T. *Variation of the mexT gene, a regulator of the MexEF-OprN efflux pump expression in wild-type strains of Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett 2000a; 192: 107-112.
106. Mizuno, T. *His-Asp phosphotransfer signal transduction*. J Biochem (Tokyo) 1998; 123: 555-563.
107. Evers, S., Courvalin, P. *Regulation of VanB-type vancomycin resistance gene expression by the VanS(B)-VanR(B) two-component regulatory system in Enterococcus faecalis V583*. J Bacteriol 1996; 178: 1302-1309.
108. Haldimann, A., Fisher, S.L., Daniels, L.L., Walsh, C.T., Wanner, B.L. *Transcriptional regulation of the Enterococcus faecium BM4147 vancomycin resistance gene cluster by the VanS-VanR two-component regulatory system in Escherichia coli K-12*. J Bacteriol 1997; 179: 5903-5913.

109. Fournier, B., Aras, R., Hooper, D.C. *Expression of the multidrug resistance transporter NorA from Staphylococcus aureus is modified by a two-component regulatory system.* J Bacteriol 2000; 182: 664-671.
110. Barbosa, T.M., Levy, S.B. *Differential expression of over 60 chromosomal genes in Escherichia coli by constitutive expression of MarA.* J Bacteriol 2000; 182: 3467-3474.
111. Alekshun, M.N., Levy, S.B. *Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: The mar regulon.* Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 2067-2075.
112. Rahmati, S., Yang, S., Davidson, A.L., Zechiedrich, E.L. *Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA.* Mol Microbiol 2002; 43: 677-685.
113. Masuda, N., Church, G.M. *Escherichia coli gene expression responsive to levels of the response regulator EvgA.* J Bacteriol 2002; 184: 6225-6234.
114. Baranova, N.N., Danchin, A., Neyfakh, A.A. *Mta, a global MerR-type regulator of the Bacillus subtilis multidrug-efflux transporters.* Mol Microbiol 1999; 31: 1549-1559.
115. Neyfakh, A.A. *The multidrug efflux transporter of Bacillus subtilis is a structural and functional homolog of the Staphylococcus NorA protein.* Antimicrob Agents Chemother 1992; 36: 484-485.
116. Diggle, S.P., Winzer, K., Lazdunski, A., Williams, P., Camara, M. *Advancing the quorum in Pseudomonas aeruginosa: MvaT and the regulation of N-acylhomoserine lactone production and virulence gene expression.* J Bacteriol 2002; 184: 2576-2586.
117. Ng, E.Y., Trucksis, M., Hooper, D.C. *Quinolone resistance mediated by norA: Physiologic characterization and relationship to flqB, a quinolone resistance locus on the Staphylococcus aureus chromosome.* Antimicrob Agents Chemother 1994; 38: 1345-1355.
118. Furukawa, H., Tsay, J.T., Jackowski, S., Takamura, Y., Rock, C.O. *Thiolactomycin resistance in Escherichia coli is associated with the multidrug resistance efflux pump encoded by emrAB.* J Bacteriol 1993; 175: 3723-3729.
119. Bohn, C., Bouloc, P. *The Escherichia coli cmlA gene encodes the multidrug efflux pump Cmr/MdfA and is responsible for isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside exclusion and spectinomycin sensitivity.* J Bacteriol 1998; 180: 6072-6075.
120. Ahmed, M., Lyass, L., Markham, P.N., Taylor, S.S., Vazquez-Laslop, N., Neyfakh, A.A. *Two highly similar multidrug transporters of Bacillus subtilis whose expression is differentially regulated.* J Bacteriol 1995; 177: 3904-3910.