

**Análisis de las repercusiones de factores somatométricos, nutricionales y bioquímicos sobre la prevalencia del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* en la Zona Básica de Salud del Marquesado (Granada)**

**D. Manuel Molina Oya**

**Granada, 15 de abril de 2012**

---



# 1. Índice temático

	<b>Págs.</b>
<b>1. Índice temático</b>	<b>3</b>
<b>2. Dedicatoria y agradecimientos</b>	<b>7</b>
<b>3. Certificaciones</b>	<b>13</b>
<b>4. Resumen</b>	<b>19</b>
<b>5. Introducción</b>	<b>23</b>
5.1. Análisis antropométrico de una población infantil.	25
5.1.1. Talla.	26
5.1.2. Peso.	26
5.1.3. Índice de masa corporal	26
5.1.4. Pliegues cutáneos.	27
5.1.5. Perímetros.	28
5.2. Estrés oxidativo y radicales libres.	29
5.2.1. Radical Superóxido ( $O_2^-$ ).	30
5.2.2. Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ).	31
5.2.3. Radical Hidroxilo (OH).	32
5.2.4. Oxígeno Singlete ( $^1O_2$ ).	33
5.2.5. Fuentes de producción de radicales libres.	33
5.2.6. Cadena de transporte de electrones mitocondriales.	34
5.2.7. Sistema xantino-oxidasa.	34
5.2.8. Metabolismo del ácido araquidónico.	34
5.2.9. Formación de radicales libres por células fagocíticas.	35
5.2.10. Metales iónicos y producción de radicales libres.	35
5.2.11. Citocromo $P_{450}$ .	36
5.2.12. Contaminantes atmosféricos y radiaciones ionizantes.	36
5.2.13. Estrés oxidativo.	36
5.2.14. Interacciones entre radicales libres e hidratos de carbono.	37
5.2.15. Interacciones radicales libres y DNA.	38
5.2.16. Interacciones radicales libres y proteínas.	38
5.2.17. Radicales libres y lípidos.	38
5.2.18. Mecanismos antioxidantes.	40
5.3. Estructura bacteriana	45
5.4. Consideraciones sobre patogenicidad bacteriana.	51
5.4.1. Prerrequisitos para la virulencia.	51
5.4.2. Factores antifagocitarios.	54
5.4.3. Catabolitos bacterianos.	55
5.4.4. Adhesión bacteriana y patogénesis.	55

5.4.5. Genética de la adhesión bacteriana: codificación de estructuras de superficie por plásmidos de resistencia.	59
5.4.6. Mecanismos de adhesión: importancia de las interacciones hidrofóbicas y su implicación en la interacción célula-célula.	61
5.4.7. <i>Neisseria meningitidis</i> . Características del microorganismo.	64
5.5. Problemática del portador asintomático de <i>N. meningitidis</i> .	67
5.6. Meningococemia y meningitis meningocócica	70
<b>6. Justificación y objetivos</b>	<b>77</b>
<b>7. Material y método</b>	<b>83</b>
7.1. Definición de la muestra.	85
7.2. Selección de la muestra y criterios de inclusión.	85
7.3. Material Clínico y de laboratorio.	94
7.4. Definición de variables bioquímicas y hematológicas.	94
7.5. Recogida de datos somatométricos.	95
7.6. Encuesta nutricional	97
7.7. Identificación de portadores de <i>N. meningitidis</i> .	98
7.8. Determinación de la capacidad antioxidante total del plasma (CATP).	102
7.9. Procesado de muestras sanguíneas	103
7.10. Estrategias de búsqueda de información.	103
7.11. Análisis estadístico.	103
<b>8. Resultados</b>	<b>113</b>
8.1. Análisis descriptivo.	115
8.2. Inferencia estadística.	124
8.2.1. Análisis de la prevalencia de portadores por localidad.	124
8.2.2. Estudio de portadores y consumo de antibióticos en la cohorte de estudio.	125
8.2.3. Análisis de la distribución de portadores por grupos de edad.	126
8.2.4. Análisis de la influencia del IMC sobre el estado de portador para cada grupo de edad.	127
8.2.5. Test de comparación de un conjunto de muestras relacionadas	128
8.2.6. Análisis de correlación entre capacidad antioxidante total del plasma y el resto de variables.	132
8.2.7.1. Análisis de regresión de la capacidad antioxidante total del plasma y las variables somatométricas en sujetos portadores y no portadores de <i>N. meningitidis</i> .	133
8.2.7.2 Análisis de regresión de la capacidad antioxidante total del plasma y las variables hematológicas en sujetos portadores y no portadores de <i>N. meningitidis</i> .	136
8.2.7.3 Análisis de regresión de la capacidad antioxidante total del plasma y las variables nutricionales en sujetos portadores y no portadores de <i>N. meningitidis</i> .	138
8.2.8. Análisis de regresión logística.	140

<b>9. Discusión</b>	<b>143</b>
9.1. Análisis de la prevalencia de portador asintomático de <i>N. meningitidis</i> en una comarca rural de la provincia de Granada	145
9.2. Análisis de las repercusiones del IMC y capacidad antioxidante del plasma sobre el estado de portador de <i>N. meningitidis</i> .	151
<b>10. Conclusiones</b>	<b>155</b>
<b>11. Abreviaturas</b>	<b>159</b>
<b>12. Bibliografía</b>	<b>165</b>



## **DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS**





## DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

---

Llegados hasta aquí es momento de hacer balance y sobre todo intentar reflejar los valores que siempre quise tener. Me gustaría con humildad y generosidad mostrar mi gratitud a toda esa gente cercana a mí que me ha acompañado durante todos estos años y me ha visto crecer tanto como pediatra como persona.

En primer lugar al **Prof. D. Antonio Muñoz Hoyos** al que tenemos la suerte de tenerlo al frente de la unidad de gestión clínica de pediatría. Admiro de él sus profundos conocimientos y experiencia en la profesión pero sobre todo su accesibilidad y cercanía en el trato personal. Valores como la honestidad, la sinceridad y el trabajo compartido en equipo son fiel reflejo de su persona.

También quiero mencionar al **Prof. D. Eduardo Narbona Lopez** que fue el primero en fijarse en mí y comenzar a estimular mi espíritu investigador. Tutor en época de mi residencia he recibido de él siempre apoyo y afecto personal.

El **Dr. Jose Uberos Fernandez** es el principal responsable de que este proyecto vea la luz. Ha conseguido ilusionarme en una parcela que tenía un tanto relegada y olvidada. No conozco a nadie con esa capacidad de trabajo y esa dedicación entregada a la profesión. Director de tesis, compañero de guardias, pero ante todo tengo la suerte de que me honres con tu amistad. Pepe para mí como para muchos compañeros eres un ejemplo de trabajo y referencia en la profesión. Esta tesis doctoral ha llegado a buen puerto sin duda por tu apoyo continuo.

No quisiera olvidar al resto de mis compañeros en el Hospital Clínico. De todos he aprendido y tras estos 16 años son para mí una verdadera familia.

En el plano personal mis primeros recuerdos son para mis abuelos, tanto los que se fueron como mi abuela nonagenaria que todavía sigue con nosotros. Siempre vi en ellos el orgullo que sentían de que su nieto fuese médico y tuve la suerte de recibir su cariño durante tantos años. Sin duda hubieran disfrutado mucho con todo esto.

A mis hermanas y a todos mis cuñados a los que considero hermanos porque se que se alegran de que haya llegado este momento y han seguido este proceso con interés. A Miguel, para mí un hermano más, por su inestimable ayuda en las traducciones del inglés. A mis sobrinas María, Julia y Daniela que son fuente de vida y alegría continua. Sin duda cualquier mal momento se arregla con su sonrisa.

A mis suegros que me han acogido en su familia como un hijo más, por su generosidad y muestras continuas de afecto.

A mis padres por su gran sacrificio personal y económico para que su hijo fuese médico. Pude salir de Torre Cardela, un pequeño pueblo de los Montes de Granada, gracias a ellos. Tanto mis hermanas como yo hemos podido tener las oportunidades que ellos no pudieron tener. Gracias por vuestro cariño y espero que verme en la lectura de esta tesis doctoral os llene de alegría y compense todo el esfuerzo realizado.

Gracias a mi mujer Cari por tu compañía, por quererme y estar conmigo en el día a día y perdonarme mis múltiples imperfecciones. Contar con tu cariño es la energía que necesito. Todos estos años juntos han pasado muy rápido y espero que la vida nos respete y nos de la suerte necesaria para que se cumplan nuestros sueños y seguir juntos mucho tiempo.

Finalmente quiero tener unas palabras de recuerdo hacia los niños. Velar por su salud, ser un abogado de la infancia es lo más bonito del mundo. Tener la suerte de tener una profesión vocacional, como es mi caso, y poder ejercerla es un privilegio para mí. Siempre he pensado que tenemos una gran responsabilidad pero con grandes momentos de satisfacción.

**A mis abuelos**

**A mis padres**

**A Cari**



## **DIRECCIÓN Y CERTIFICACIONES**



---

## DIRECCIÓN Y CERTIFICACIONES

---



**Análisis de las repercusiones de factores somatométricos,  
nutricionales y bioquímicos sobre la prevalencia del estado de  
portador asintomático de *N. meningitidis* en la Zona Básica de  
Salud del Marquesado (Granada)**

por

Manuel Molina Oya

Memoria presentada para aspirar

al grado de Doctor por la Universidad de Granada

Fdo. Manuel Molina Oya

Los directores de tesis

Dr.D. Jose Uberos Fernandez

Profesor Asociado de Pediatría

Universidad de Granada

Dr. Eduardo Narbona López

Profesor titular de Pediatría

Universidad de Granada



**D. José Uberos Fernández**, Doctor en Medicina por la Universidad de Granada y profesor asociado en Ciencias de la Salud de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que D. Manuel Molina Oya, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado su Trabajo de Investigación Prospectivo para la confección de la Memoria de TESIS DOCTORAL, bajo mi dirección sobre el tema: "Análisis de las repercusiones de factores somatométricos, nutricionales y bioquímicos sobre la prevalencia del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* en la Zona Básica de Salud del Marquesado (Granada)", la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada.

Granada, 15 de Abril de 2012

Dr. D. J. Uberos Fernández





**D. Eduardo Narbona López**, Doctor en Medicina por la Universidad de Granada y profesor titular de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que D. Manuel Molina Oya, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado su Trabajo de Investigación Prospectivo para la confección de la Memoria de TESIS DOCTORAL, bajo mi dirección sobre el tema: "Análisis de las repercusiones de factores somatométricos, nutricionales y bioquímicos sobre la prevalencia del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* en la Zona Básica de Salud del Marquesado (Granada)", la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada.

Granada, 15 de Abril de 2012

Dr. D. Eduardo Narbona López



## **RESUMEN**



## RESUMEN

---

*N. meningitidis* es un microorganismo frágil, que precisa un estrecho contacto entre huéspedes para asegurar su transmisibilidad. La relación existente entre estado de portador y desarrollo de enfermedad invasiva es multicausal, aunque clásicamente se implican tres factores: huésped, ambiente y cepa bacteriana.

El interés del estudio del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* deriva de la posibilidad de que el huésped pueda albergar y ser vehículo de cepas patógenas originando en niños susceptibles el desarrollo de enfermedad invasiva.

El estrés oxidativo se ha relacionado con la respuesta inmunitaria alterada en algunas enfermedades crónicas, infecciosas y tumorales.

En nuestro estudio planteamos la necesidad de conocer la situación epidemiológica del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* en nuestro medio. Planteamos como hipótesis:

1. Que las alteraciones del equilibrio REDOX del huésped pueden explicar la persistencia del estado de portador en algunos niños e incluso en situaciones extremas la progresión hacia la enfermedad meningocócica.
2. Que las situaciones de aumento de adiposidad, relacionadas por otros autores con un aumento de radicales libres se asociarían con mayor prevalencia de portadores de *N. meningitidis*.
3. Que las disminuciones en la capacidad antioxidante total del plasma se podrían asociar con un aumento en la prevalencia de portadores asintomáticos de *N. meningitidis*.

Sobre una población posible de la comarca de 704 niños hemos reclutado previo consentimiento informado a 324 niños. De ellos, 20 resultaron ser portadores de *N. meningitidis*, lo que supone una prevalencia efectiva del 6,5%. Con un diseño de caso-control anidado, hemos seleccionado 1 control por cada portador. Se analizan variables somatométricas, nutricionales, hematológicas, bioquímicas y capacidad antioxidante total del plasma.

Tanto los casos como los controles se mostraron homogéneos para las variables somatométricas y hematológicas consideradas. Encontramos una capacidad antioxidante total del plasma de 0,13 1/IC 50 (IC 95 % : 0,05 – 0,21) en portadores asintomáticos frente a 1,43 1/IC 50 (IC 95 % : -4,4 – 7,27) en los controles. El resto de las variables consideradas no mostraron diferencias significativas. Observamos una tendencia

significativa a aumentar el riesgo de portador de *N. meningitidis* en sujetos con sobrepeso y obesidad, con riesgo significativamente mayor de portador en pacientes obesos.

Según se desprende de los puntos anteriores evidenciamos una capacidad antioxidante del plasma más baja en sujetos portadores de *N. meningitidis* y tras ajuste por grupos de edad, mayor prevalencia de portadores en sujetos con sobrepeso y obesos.

## **INTRODUCCIÓN**





## INTRODUCCIÓN

---

### 5.1. Análisis antropométrico de una población infantil.

La antropometría nutricional es una técnica inocua cuyo objetivo es investigar el crecimiento y desarrollo físico del niño (1). Tiene la sencillez de la recogida de datos y su reproductividad. De entre la gran variedad de parámetros antropométricos que definen el tamaño y morfología corporal, hay un grupo reducido que, aisladamente o en combinación con otros, van a definir de una forma bastante precisa, el estado nutricional del sujeto reemplazando a otros métodos más sofisticados. El crecimiento que a lo largo de la infancia no sigue un ritmo lineal presenta aceleraciones y desaceleraciones que siguen con bastante aproximación un patrón matemático descrito en su día por Karlberg; estas ecuaciones, que siguen la lógica de un análisis de regresión, permiten dividir la infancia en tres periodos, que podríamos definir como infancia precoz, infancia tardía y adolescencia. El primer período que este autor lo delimita hasta los 3 años se caracteriza por un patrón de crecimiento rápido y sus determinantes fundamentales serían condicionamientos genéticos; le siguen un periodo de relativo enlentecimiento del crecimiento y a partir de los 9 años un periodo de aceleración del crecimiento debido en su mayoría al efecto sumatorio de esteroides sexuales y somatotropina (2).

La recogida de los parámetros antropométricos debe efectuarse siguiendo unas normas aceptadas internacionalmente que minimicen el error sistemático de medición inter o intraobservador, aportando precisión y fiabilidad. Por otro lado, la uniformidad metodológica debe permitir la comparabilidad y reproductividad de los resultados de los estudios realizados para diferentes poblaciones. Los parámetros que se han demostrado útiles en la evaluación nutricional son los siguientes: talla, peso, perímetro craneal, perímetro bicipital y pliegues cutáneos.

Los distintos parámetros pueden clasificarse en:

- Medidas de dimensiones corporales: longitud, talla, perímetros, diámetros.
- Medidas de la composición corporal: peso, pliegues cutáneos, índices corporales.
- Medidas de maduración: ósea y sexual (3).

En líneas generales se puede afirmar que el peso, perímetro del brazo y panículo adiposo reflejan las alteraciones recientes de la nutrición, mientras que la talla se afecta sólo en los cuadros crónicos.

### 5.1.1. Talla.

En el niño sano el percentil de su talla está en relación fundamentalmente con su patrón genético. Su percentil de talla se mantiene por lo general constante a lo largo de su período de crecimiento, siempre que no haya alteraciones ambientales u orgánicas que comprometan el normal proceso de nutrición.

El período inicial hasta los dos años se caracteriza por una velocidad de crecimiento rápida, con unas cifras medias de 20-22 cm en el primer año y de 12 cm en el segundo. La etapa de la niñez se caracteriza por un descenso del ritmo de los 2 a los 4 años, siendo la media de 9 cm del 2º al 3º año y de 7 cm del 3º al 4º año. A la edad de 4 años, el niño duplica su talla del nacimiento. A partir de esta edad la velocidad de crecimiento estatural es del orden de los 5 a 6 cm por año (4). Al mismo tiempo se van modificando las proporciones del cuerpo por un alargamiento del segmento inferior, que llega a igualarse al superior, llegando a ser el cociente segmento inferior/segmento superior igual a la unidad. En la adolescencia se produce una nueva aceleración del crecimiento, que comienza hacia los 10-11 años en las niñas y hacia los 12-13 años en los niños, teniendo siempre en cuenta que el brote puberal tiene más relación con la maduración ósea que con la edad cronológica.

### 5.1.2. Peso.

Refleja el estado de crecimiento y de nutrición. El peso del recién nacido es superior en varones que en hembras, aumenta rápidamente en el transcurso del primer año de vida, duplicándose al final del 4º mes y se triplica al final del 10º. A partir de los 2 años la curva ponderal es más homogénea con una ganancia anual media de 2 a 2.5 kg. A los 3 años se cuadriplica el peso al nacimiento. En la adolescencia hay un desarrollo de masa muscular en el varón y de tejido subcutáneo en la hembra, precediendo a menudo al brote estatural (3). En la práctica se han establecido los percentiles 90 y el 10, o  $\pm 3DS$ , en relación tanto al peso como a la talla, para definir los límites de los niños sospechosos de obesidad o malnutrición respectivamente.

### 5.1.3. Índices corporales (índice nutricional e índice de masa corporal)

Los índices que valoran exclusivamente el peso del niño no informan de la composición corporal, por lo que resulta de utilidad el empleo de otros indicadores antropométricos. Para evitar las diferencias en cuanto a las variaciones genéticas del peso de los niños en relación fundamental con la talla; se establece como parámetro de significación nutricional el peso en relación a la talla, con el uso generalizado de indicadores como el:

- $\text{Índice nutricional} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Talla (m)}}$
- $\text{Índice de masa corporal} = \frac{\text{Peso (Kg)}}{\text{Talla (m}^2\text{)}}$

Como resultado podemos distinguir los siguientes grupos nutricionales:

- Inferior a 90: Malnutrición.
- 90-110: Normal.
- 110-120: Sobrepeso.
- Superior a 120: Obesidad.

Más adecuadas son las curvas de distribución del cociente índice nutricional con relación a la edad. Un dato interesante y a recordar es que en los niños con edades superiores a los 10 años, el índice de masa corporal (IMC) se relaciona positivamente con las lipoproteínas de baja densidad (LDL-C) y negativamente con las lipoproteínas de alta densidad (HDL-C), lo que asociado a la elevación de la TA que acontece en los individuos obesos, hace de este índice sea un estimador más de riesgo coronario.

#### 5.1.4. Pliegues cutáneos.

La medición de estos pliegues tiene como único objeto la determinación de la grasa subcutánea, la cual se estima que constituye el 50% de la grasa corporal (1). Para su medición usamos compases de precisión, el más utilizado es el modelo Holtain Skinfold Caliper, cuya precisión es de 0.2 mm. Su uso correcto minimiza el error intra e interobservador siendo el mismo no superior a 0.6 mm. Convencionalmente la medición la debemos de realizar en el hemicuerpo izquierdo. La medición debe realizarse en las zonas siguientes:

- Pliegue tricaptal. Se mide en la parte posterior del brazo izquierdo, en un punto situado a mitad de camino entre el acromion y el olécranon, con el brazo colgado relajado al costado del paciente.
- Pliegue bicaptal. A nivel del músculo bicaptal en la zona anterior del brazo izquierdo.
- Pliegue subescapular. Por debajo del ángulo de la escápula izquierda.
- Pliegue suprailíaco. Medido 1 cm por encima y 2 cm por dentro de la espina suprailíaca anterior.

La capa grasa subcutánea tiene una curva propia de crecimiento totalmente diferente al resto de los tejidos, creciendo desde el nacimiento hasta los nueve meses, a partir de los cuales tiene una velocidad nula o negativa, hasta la edad de seis a ocho años que empieza a aumentar de nuevo y a partir de los ocho años las curvas para las niñas y niños divergen de una forma radical. Todos los valores de los pliegues de las hembras exceden a la de los varones siendo a los doce años cuando se encuentra mayor diferencia (1). La interpretación de estos valores de medida con respecto al estado nutricional del niño, precisa estándares de referencia adecuados. En nuestro país disponemos de curvas de distribución propias, las últimas recogidas en el documento Consenso de la AEP (5). En nuestro medio niños con valores por encima del percentil 90 pueden ser etiquetados de obesos. Los que presenten valores por debajo del percentil 3 se catalogan de desnutridos.

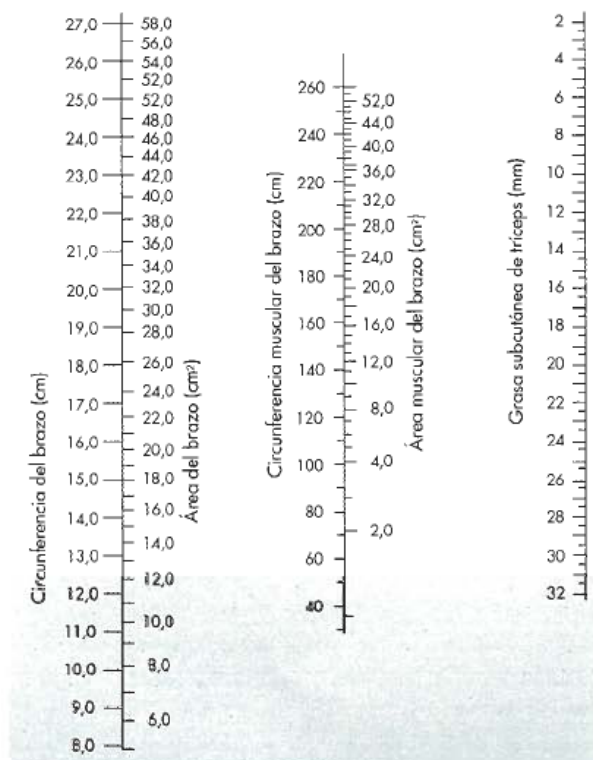
Actualmente se admite que el pliegue del tríceps estima la obesidad generalizada o periférica, mientras que el pliegue subescapular mide preferentemente la obesidad troncular. Esta última tiene mayor transcendencia epidemiológica, ya que se ha demostrado que tanto el pliegue subescapular como el suprailíaco son mejores predictores de la obesidad adulta que los pliegues de las extremidades.

Una utilidad adicional de los pliegues es su uso para el cálculo de la densidad corporal y el porcentaje de grasa, a través de unas ecuaciones que incorporan los valores del IMC y de los cuatro pliegues: tríceps, bíceps, suprailíaco y subescapular; obteniendo por métodos no cruentos y sencillos, la masa de grasa corporal total, y por sustracción, la masa magra, de la que depende el metabolismo basal, tanto en obesos como no obesos, sustituyendo a la densitometría cuya técnica es mucho más dificultosa.

### 5.1.5. Perímetros.

El perímetro braquial es el de mayor interés en antropometría nutricional, medido en el brazo izquierdo. Los valores del perímetro braquial son reflejo de una serie compleja de factores entre los que figura la ingesta proteica, por lo que la circunferencia del brazo se considera un sencillo índice de evaluación del músculo esquelético. Se considera una medida de desnutrición, útil y fácil de obtener. Un valor inferior al 75% de la media para la edad indica malnutrición grave, entre 75-80% moderada, entre 80-85% leve y por encima del 85% se considera normal.

Dado que el valor de este perímetro depende de los compartimentos - grasa y muscular - en el brazo, se han ideado fórmulas para que, conjuntamente con el pliegue del tríceps, poder estimar el área muscular y el área grasa a este nivel. Puede usarse indistintamente el normograma de Gurney y Jelliffe (Figura 1).



*Figura 5.1. Normograma de Gurney y Jelliffe.*

Estas áreas constituyen un instrumento metodológico útil en estudios nutricionales. Se considera que el área muscular mide la reserva proteica, mientras que el área grasa estima la reserva energética, por lo que tiene interés en el estudio de la malnutrición proteico-calórica. En base a estos valores se ha establecido el Índice Adiposo Muscular, que resulta del cociente entre el área grasa y el área muscular. Una información parecida aporta el Cociente Adiposo Muscular, obtenido al dividir el pliegue del tríceps entre el perímetro del brazo.

### 5.2. Radicales libres.

Es evidente el interés creciente de los radicales libres y los antioxidantes tanto en el ámbito social como en el de la salud, existiendo en la actualidad una *Sociedad Internacional para el estudio de los radicales libres y del oxígeno*, cuyas publicaciones recoge periódicamente la revista *Free Radical Biology et Medicine*. La importancia de los radicales libres (RL) se debe a su implicación en procesos patológicos en el campo de la psiquiatría, neurología, cardiología, oftalmología, neumología, gastroenterología, nefrología, endocrinología, dermatología y gerontología.

La homeostasis celular se mantiene, gracias al equilibrio que guardan entre sí diversos mecanismos biofísicos, bioquímicos y agentes externos, lo cual conduce a la salud celular y del organismo en su conjunto. Cuando se produce una lesión celular, aunque no siempre es posible encontrar el punto donde se ha producido el daño celular, se sabe que son fundamentalmente cuatro los sistemas celulares básicos especialmente vulnerables: la membrana celular, la respuesta aeróbica, la síntesis de proteínas y el aparato génico de la célula. En los organismos eucariotas, el oxígeno ( $O_2$ ) constituye una de las principales vías generadoras de energía, dependiendo de su metabolismo la formación de las moléculas de ATP.

El oxígeno cuya acción beneficiosa para la vida es indiscutible, puede por el contrario perjudicarla, convirtiéndose en un elemento tóxico que puede provocar la muerte. La toxicidad del  $O_2$  es debida a la producción de RL, moléculas lesivas para la célula, cuya fuente principal es el  $O_2$ , aunque pueden ser generadas por distintas moléculas orgánicas e inorgánicas.

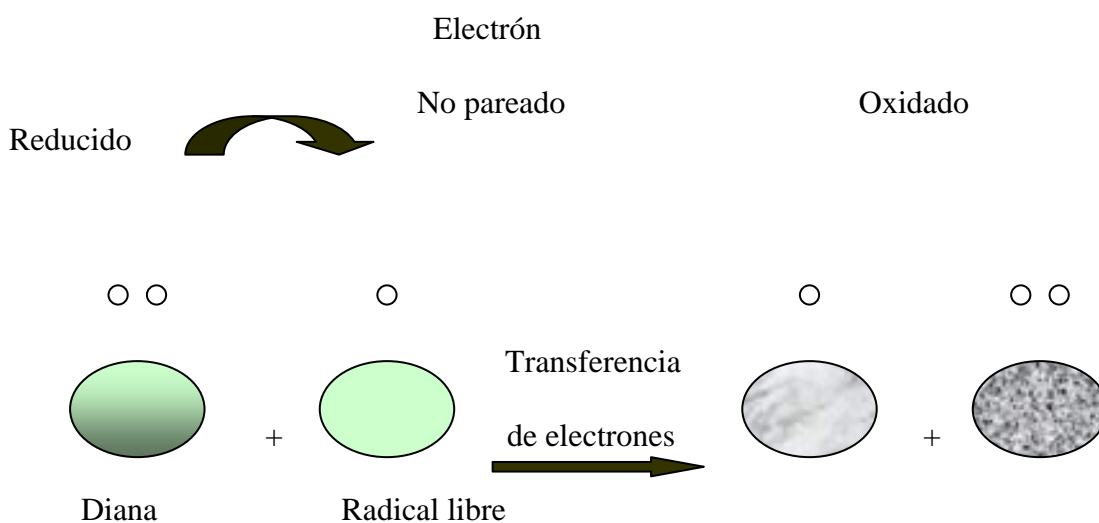
La célula dispone de mecanismos de control antioxidantes, que neutralizan los RL, capaces de mantener un equilibrio con el estrés oxidante, evitando de esta forma su lesión. No obstante, ante estados o circunstancias patológicas como irradiación, drogas, hipoxia mantenida... pueden no ser suficientes estos mecanismos neutralizadores, produciéndose entonces una alteración celular reparable o irreparable. Además, los mecanismos de oxidación son utilizados por el organismo como defensa frente a las infecciones por diversos microorganismos que a su vez han desarrollado en algunos casos mecanismos adaptativos a niveles de oxidación *a priori* lesivos.

Algunos autores han definido a los RL como cualquier sustancia (molécula o átomo) capaz de una existencia independiente, que contiene uno o más electrones no apareados en su última órbita electrónica (número impar de electrones) (6). Pueden estar cargados positiva o negativamente, o bien ser eléctricamente neutros. El estrés oxidativo se produce cuando los radicales libres reaccionan con moléculas de su entorno, que se dañan en función de su mayor o menor grado de reactividad. Esta reactividad le viene al radical libre de la existencia de un electrón no apareado, lo cual implica una tendencia a ganar o ceder rápidamente un electrón para conseguir su estabilidad. Este hecho le confiere un gran poder para oxidar moléculas biológicas como las proteínas, los lípidos y los ácidos nucleicos.

Siempre que un radical cede un electrón, toma un electrón o simplemente se une a una molécula no radical, ésta se transforma en radical (7). Un radical libre puede convertirse en estable cuando capta un electrón de una molécula diana, pero a cambio ha creado un nuevo radical libre (Figura 5.2), el cual puede tener una reactividad alta afectando a otras células diana y dando lugar con ello a una reacción en cadena, o una

reactividad baja, quedando interrumpida la cadena. En caso de unión de dos radicales, ambos desaparecerán como tales (6). Con el nombre de “*especies reactivas de oxígeno*” (ERO), se conocen a los radicales libres derivados del oxígeno; éstos tienen un papel fundamental en los procesos fisiológicos y patológicos y son: anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo (HO).

El proceso de formación de los radicales libres en los diversos procesos biológicos es continuo, bien sea de forma “*accidental*”, como ocurre cuando hay escape de electrones de las cadenas de transporte mitocondriales o autooxidaciones, o bien de forma “*fisiológica*”, como sucede durante la activación de fagocitos o, en menor grado, por células diferenciadas tipo fibroblastos o linfocitos.

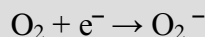


**Figura 5.2.** Representación esquemática de la reacción de un radical libre con una molécula.

Sabiendo que los radicales libres se están formando continuamente es evidente que el organismo debe disponer de un sistema adecuado para evitar la oxidación, y una vez que ha ocurrido ésta, reparar este daño oxidativo producido por los radicales libres (8).

### 5.2.1. Radical Superóxido ( $O_2^-$ ).

Es un radical libre que se forma tras una reducción monovalente o monoelectrónica del oxígeno molecular.



Es conocida su implicación en diversos procesos citotóxicos, a pesar de ser una especie menos reactiva que otros radicales (8). Su actuación no es directa, sino que se comporta como fuente de  $H_2O_2$  u otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (9).

Los radicales superóxido se producen en numerosas reacciones enzimáticas y no enzimáticas, aunque parece que su principal fuente de formación tiene lugar en la

cadena mitocondrial de transporte de electrones. Otras fuentes de producción son las reacciones catalizadas por la xantino-oxidasa y la aldehído-oxidasa, el escape de electrones del citocromo P<sub>450</sub> en el retículo endoplasmático hepático, o en la autooxidación de moléculas como hemoproteínas, hidroquinonas, catecolaminas, ascorbato, tioles, etc. (10).

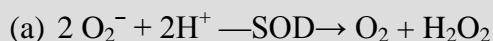
**Tabla 5.1.** Algunos radicales libres y su blanco biológico típico.

Radical	Nombre	Vida media	Blanco biológico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido	10 <sup>-5</sup> <sub>s</sub>	Enzimas
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno	Estable	Ácidos grasos insaturados
HO	Radical hidroxil	10 <sup>-9</sup> <sub>s</sub>	Todas las moléculas
R <sup>·</sup>	R-ilo	10 <sup>-8</sup> <sub>s</sub>	Oxígeno
RO <sup>·</sup>	R-oxilo (alcoxilo)	10 <sup>-6</sup> <sub>s</sub>	Ácidos grasos insaturados
ROO <sup>·</sup>	R-dioxilo (peroxilo)	7 <sub>s</sub>	Ácidos grasos insaturados
ROOH <sup>·</sup>	Hidroperóxidos		Ácidos grasos insaturados
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Singlete de oxígeno	10 <sup>-6</sup> <sub>s</sub>	H <sub>2</sub> O
HOCL	Ácido hipocloroso	Estable	Distintas moléculas
NO	Radical de óxido nítrico	~1 <sub>s</sub>	Distintas moléculas

El anión superóxido puede transformarse en radical perhidroxilo (HO<sub>2</sub><sup>·</sup>) cuando el pH es bajo. Este nuevo radical es más reactivo y tiende a reaccionar con lipoperóxidos ya formados originándose radicales peroxilo. Esta transformación, cuando el pH es fisiológico se produce en una proporción muy inferior (<1%) (9).

### 5.2.2. Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Se trata de un metabolito del oxígeno intracelular que se forma, bien por una dismutación del anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) (a), o directamente por reducción bivalente del oxígeno (b).



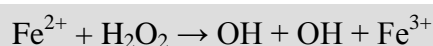
El peróxido de hidrógeno no es un radical libre en sentido estricto, ya que carece de electrones desapareados (11); sin embargo, está incluido en el grupo de “especies reactivas del oxígeno” debido a su capacidad para atravesar membranas biológicas y de generar (en presencia de iones metálicos de transición o de oxígeno) el radical hidroxilo (OH).

En condiciones fisiológicas la principal fuente de producción de peróxido de hidrógeno son las mitocondrias (produciéndose el 15% del total en el hígado) y en segundo lugar, los peroxisomas y el citosol celular (35% y 5%, respectivamente) (12). Aunque la reactividad química del anión superóxido es limitada, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede atravesar sin dificultad las membranas biológicas, llegando a producir lesiones

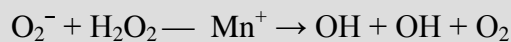
oxidativas en macromoléculas, distante de su lugar de producción (11). Algunos estudios ponen de manifiesto que la acción citotóxica del  $\text{H}_2\text{O}_2$  no se produce directamente, sino a través de sustancias de mayor reactividad, originadas a partir del  $\text{H}_2\text{O}_2$  y otro agente reductor, como el  $\text{O}_2^-$  o un ión metálico como el  $\text{Fe}^{2+}$ .

### 5.2.3. Radical Hidroxilo (OH).

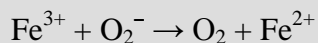
Es el radical más reactivo entre las especies oxigénicas que se conocen, y puede reaccionar de forma directa con cualquier molécula biológica. De hecho, la citotoxicidad de los radicales  $\text{O}_2^-$  y  $\text{H}_2\text{O}_2$  radica, como ha quedado expuesto anteriormente, en la producción de este radical, ya que estas moléculas presentan una reactividad limitada. La reactividad del (OH) es alta e indiscriminada, considerándose que es uno de los principales iniciadores de la peroxidación lipídica (13). Este radical surge de la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, como el hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y el cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ). Cuando es el hierro el que participa en la producción del (OH), tiene lugar la reacción de Fenton:



La *reacción de Haber-Weiss*, conocida en algunos casos como “*reacción de Fenton conducida por el  $\text{O}_2^-$* ” consiste en la producción de hidroxilo, inducida por el anión superóxido (9).



La *reacción de Haber-Weiss*, se puede entender como el resultado de la unión o colaboración de la reacción de Fenton con la capacidad del anión superóxido para reducir metales iónicos de transición.



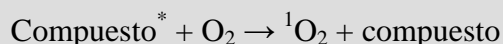
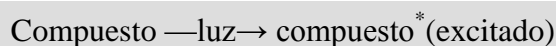


Otras fuentes de producción del radical hidroxilo son:

- Fisión del agua provocada por exposición a radiaciones ionizantes.
- Fotones del peróxido de hidrógeno.
- Reducción del ozono por transferencia electrónica.
- Interacción radical-peróxidos orgánicos.

#### 5.2.4. Oxígeno Singlete ( $^1\text{O}_2$ ).

Aunque no es un radical propiamente dicho, es una de las principales especies junto con el radical hidroxilo, capaz de reaccionar directamente con macromoléculas como los ácidos grasos (14). Se produce principalmente, cuando ciertos compuestos absorben luz al ser iluminados en presencia de oxígeno, adquiriendo de esta forma un estado de excitación electrónica, transfiriéndose este exceso de energía al oxígeno y transformándose en oxígeno singlete (15).



Esto es lo que le sucede a colorantes tales como la eosina, a determinadas drogas como las tetraciclinas y a sustancias que se encuentran en el organismo, como las porfirinas, rivoftalinas y bilirrubina. Una segunda vía de producción del oxígeno singlete es la reacción entre peróxidos, siendo baja la probabilidad de colisión. Por último, Kanosfky y Sima (16), han encontrado que otra forma de producción de este radical consiste en la interacción del ozono con ciertas moléculas biológicas.

#### 5.2.5. Fuentes de producción de radicales libres.

La formación de RL, puede acontecer de forma fisiológica o patológica, utilizando diversos mecanismos (Tabla 5.2).

**Tabla 5.2.** Procedencia del estrés oxidativo.

FUENTE	MECANISMO
Transporte mitocondrial de electrones	Superóxidos por reducción ineficiente de $\text{O}_2$
Metales iónicos	$\text{Cu}^{++}$ y $\text{Fe}^{++}$ facilitan radicales hidroxil
Células inflamatorias	Radicales libres por fagocitos activados
Enzimas ( <i>xantina oxidasa</i> )	Reperusión de tejidos isquémicos
Drogas (paraquat, Adriamicina, paracetamol)	Intermediarios metabólicos
Humo cigarrillos	Fase gaseosa rica en radicales libres
Radiación	Rayos X, luz ultravioleta

### 5.2.6. Cadena de transporte de electrones mitocondriales.

Se considera como la mayor fuente formadora de RL. El 90-95% de todo el oxígeno que llega a la mitocondria es metabolizado a agua a través de la vía de la reducción tetravalente, sin formación de intermediarios tóxicos.

Queda un 5-10% de oxígeno que sufre una reducción monovalente por electrones procedentes de los transportadores de la cadena que escapan al control de la misma (12), dando lugar a la formación de *anión superóxido*, el cual rápidamente se dismuta (por acción de la *superóxido dismutasa*) a *peróxido de hidrógeno* (17), con la consiguiente formación posterior de radical hidroxilo mediante *reacción de Fenton o de Haber-Weiss*.

Se sabe que la producción de superóxido aumenta en las siguientes situaciones:

- Ante el incremento en la concentración o consumo de oxígeno, como sucede en la actividad física, en la que el consumo de oxígeno puede verse incrementado unas 10-40 veces en relación al estado de reposo (18).
- Cuando la cadena de transporte de electrones está completamente reducida, como sucede durante los periodos de isquemia y reperfusión (19).

### 5.2.7. Sistema xantino-oxidasa.

La *xantino oxidasa* es la enzima que se encarga de catalizar la oxidación de hipoxantina a xantina y de ésta a ácido úrico, acoplando a dicha oxidación una reducción monovalente del oxígeno molecular, con la consiguiente formación de anión superóxido. Cuando los mecanismos homeostáticos celulares se alteran, como sucede en situaciones de isquemia, se puede producir aumento del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. Esta situación provoca la activación de enzimas dependientes del calcio como las *proteasas* (19). Como resultado se produce un incremento proporcional de la conversión de *xantina deshidrogenasa* a *xantina oxidasa*, motivado tanto por el incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular como por la activación de determinadas *proteasas* (20). La xantino-oxidasa puede resultar inhibida por allopurinol o por 2-amino-4-hidroxi-6-formilpteridina (pteridil-aldehído) (8).

### 5.2.8. Metabolismo del ácido araquidónico.

El ácido araquidónico ( $\text{C}_{20}$ : 4n6) es un ácido graso insaturado de cadena larga que tiene cuatro dobles enlaces. La mayoría de las prostaglandinas y tromboxanos se sintetizan a partir de este compuesto, pudiendo ser ésta una fuente de producción de radicales libres a nivel del endotelio vascular. El ácido araquidónico se produce tras la activación de fosfolipasas calcio-dependientes que acontece como consecuencia del aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en situaciones fisiológicas, como sucede durante los episodios de isquemia. Por la vía ciclooxigenasa, el ácido araquidónico sufre una primera oxigenación mediante la cual se origina la prostaglandina  $\text{G}_2$  ( $\text{PGG}_2$ ) que, más tarde y mediante la acción de la prostaglandina  $\text{H}_2$ -sintetasa, se convierte en prostaglandina  $\text{H}_2$  ( $\text{PGH}_2$ ). Es en esta última etapa y en presencia de NADH o NADPH, donde se puede generar  $\text{O}_2^-$  (21). La síntesis de oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ) se lleva a cabo a través de la vía lipooxigenasa (22). Por ambas vías se pueden formar peróxidos

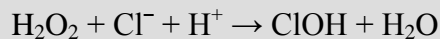
intermedios que, junto con los radicales libres, pueden incrementar el daño en situaciones patológicas (23).

#### 5.2.9. Formación de radicales libres por células fagocíticas.

Las células fagocíticas generan radicales libres, por el sólo hecho de tener una actividad bactericida. El lugar de formación de estos radicales libres se encuentra ubicado en el entorno de la membrana plasmática que envuelve la bacteria, lo cual hace bastante fácil el escape de alguno de los RL, entre los que se encuentra el *anión superóxido* ( $O_2^-$ ). Este último se puede originar también de la oxidación espontánea de las flavinas reducidas y de las catecolaminas. Neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares poseen en su membrana el sistema flavoproteico *citocromo b<sub>254</sub> NADPH-oxidasa*. El denominado “estallido respiratorio” es el incremento en el consumo de oxígeno que se produce durante la actividad fagocitaria, siendo la mayor parte del mismo utilizado en la producción de  $O_2^-$  derivado de la síntesis de NADPH a partir de hexosas monofosfato (24).



La *mieloperoxidasa* que se encuentra en las células fagocíticas presenta una actividad enzimática altamente microbicida. Esta enzima, tras ser activada por el  $H_2O_2$  (que ha sufrido una dismutación por el anión superóxido), oxida el  $Cl^-$  produciendo ácido hipocloroso (HClO), que a su vez oxida los grupos sulfhidrilo ( $-SH$ ) (23). Una deficiencia congénita de esta enzima (*Enfermedad Granulomatosa Crónica*) favorece la aparición de infecciones de repetición.



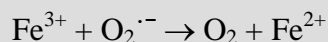
El pH existente en situaciones de inflamación y fagocitosis facilita la liberación de iones metálicos, conduciendo a la formación de radical hidroxilo en los fagolisosomas por la clásica *reacción de Fenton* (25).

El *óxido nítrico* (NO), radical formado durante la fagocitosis, produce un efecto citotóxico en la defensa contra células tumorales, hongos, parásitos, protozoos, helmintos y micobacterias (26). Este radical libre al reaccionar con el  $O_2^-$  produce peroxinitritos que darán lugar por descomposición al OH. Durante la fagocitosis, el daño oxidativo producido sobre las membranas por escape de radicales libres se acentúa por un incremento en el metabolismo del ácido araquidónico, cuya liberación de las membranas aumenta durante el citado proceso de fagocitosis.

#### 5.2.10. Metales iónicos y producción de radicales libres.

Algunos radicales libres como el *anión superóxido* ( $O_2^-$ ) y el *peróxido de hidrógeno* ( $H_2O_2$ ), aunque poseen una baja reactividad directa sobre macromoléculas, pueden dar lugar a otros radicales más reactivos como el *radical hidroxilo* (OH) requiriendo para ello la presencia de metales de transición, principalmente hierro ( $Fe^{2+}$ ) y cobre ( $Cu^{2+}$ ) (27). La generación de OH a partir del hierro ( $Fe^{2+}$ ) se produce mediante la *reacción de Fenton*, en la cual son necesarios agentes reductores como el ascorbato y

el anión superóxido, para oxidar el ión férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que no es reactivo con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ).



El cobre es otro ión metálico que se utiliza con frecuencia *in vitro* y que produce mayor daño a bases del DNA que el hierro, debido a su mayor capacidad para la formación de especies reactivas del oxígeno. Estos iones se encuentran almacenados en el organismo y son transportados por proteínas especiales; de esta manera, el hierro “libre” se transporta como transferrina y se almacena como ferritina y hemosiderina. Desde estos reservorios y ante situaciones de estrés oxidativo se pueden liberar iones metálicos.

#### 5.2.11. Citocromo P<sub>450</sub>.

El sistema citocromo P<sub>450</sub> puede reducir compuestos generando radicales libres. Un ejemplo de este proceso es la eliminación de alcoholes como el etanol por el citocromo P<sub>450</sub> dando lugar a la formación de hidroxietileno a nivel hepático (28)

#### 5.2.12. Contaminantes atmosféricos y radiaciones ionizantes.

Tanto la inhalación del aire que respiramos y poluciones medioambientales como el humo del tabaco contienen una serie de radicales libres como el dióxido de nitrógeno, ozono, dióxido de azufre, óxido de nitrógeno, óxido nítrico, etc., que en altas concentraciones pueden producir lesiones características en el tracto respiratorio. Por otro lado, algunos átomos y moléculas, como el oxígeno, pueden ser activadas por la luz solar (en su espectro visible e invisible) y las radiaciones ionizantes hasta un estado de excitación. Un electrón apareado del orbital completo salta a un orbital más externo (singlete excitado) y al cambiar su espín se transforma en un *triplete excitado*, que ya es un radical libre.

#### 5.2.13. Estrés oxidativo.

Se conoce como estrés oxidativo al daño producido por los radicales libres que de forma continua se producen en el organismo. Muchos de estos radicales libres se sintetizan de forma habitual en el organismo, al estar implicados en vías metabólicas y cumpliendo por tanto una función biológica, no resultando los mecanismos antioxidantes efectivos al 100% (15).

La formación de radicales libres puede dar lugar a diversas situaciones desfavorables para el organismo, entre las que cabe destacar:

- Desnaturalización de las proteínas presentes en el citosol y las enzimas de membrana, incluyendo el inhibidor de la alfa 1-proteinasa.
- Liberación de factores quimiotácticos que provocan la llegada de leucocitos activados que generan a su vez radicales libres como mecanismo bactericida.

- Desnaturalización del DNA.
- Inicio de la peroxidación lipídica, provocando un incremento en la permeabilidad de membranas, alteración de los canales iónicos, etc. La peroxidación lipídica genera hidroperóxidos y aldehídos, produciéndose un daño de tipo oxidativo a nivel proteico y del DNA.

De lo expuesto hasta ahora se deduce la necesidad de mantener un equilibrio entre la formación de radicales libres y los sistemas de protección, con el fin de neutralizar y/o reparar el daño producido por estas especies. A este equilibrio se le conoce como “balance oxidativo” y de su mantenimiento se encargan los sistemas antioxidantes. El “estrés oxidativo” tiene lugar cuando se rompe este equilibrio, bien por exceso de formación de radicales libres, o bien por fallo de los mecanismos de defensa, produciéndose entonces el daño directo o indirecto sobre el tejido, de mayor o menor grado, según la duración y la naturaleza del sistema estresado (15).

El estrés oxidativo está presente en una gran variedad de enfermedades, existiendo opiniones controvertidas sobre si es el estrés oxidativo el causante del daño celular, o bien es el daño celular el que, mediante el aumento de los radicales libres produce el estrés oxidativo; en la actualidad parece prevalecer la primera suposición (20).

#### 5.2.14. Interacciones entre radicales libres e hidratos de carbono.

Algunos azúcares, como la glucosa y el manitol, reaccionan con el OH produciéndose su degradación por estrés oxidativo (autooxidación) y generándose nuevos radicales libres. Para ello es necesaria la participación de un metal de transición (cobre, hierro) que catalice la reacción. De esta forma y con la ayuda del oxígeno, se iniciaría la cadena  $O_2^- \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH$  provocando la aparición de radicales peróxido a partir de cualquier cadena carbonada larga (proteínas, lípidos, etc.).

En condiciones fisiológicas, los monosacáridos son capaces de reducir el oxígeno molecular autooxidándose y formando cetoaldehídos e intermediarios oxidantes como  $O_2^-$  en un proceso catalizado por metales de transición (29). De forma paralela, la glucosa se uniría a proteínas en los grupos amino terminal, iniciando la glicación de las proteínas según la reacción de Maillard (18).

Proteínas + glucosa  $\rightarrow$  Bases de Schiff  $\rightarrow$  Productos de Amadori  $\rightarrow$   
Deoxigluconosa  $\rightarrow$  Productos Maillard (productos de gluconación avanzada)

Todos estos productos poseen una elevada reactividad, lo que conduce a un trastocamiento en la estructura espacial de las proteínas en presencia de altas concentraciones de glucosa, produciéndose degeneración proteica, disfunción de los macrófagos, incremento de la peroxidación lipoproteica, etc., y traduciéndose todo ello clínicamente en envejecimiento, aterosclerosis, cataratas, etc. (30).

#### 5.2.15. Interacciones radicales libres y DNA.

El estrés oxidativo acarrea una serie de consecuencias sobre el DNA, tales como el incremento de mutaciones, entrecruzamientos, roturas espontáneas en las cromátidas o pérdida de fragmentos cromosómicos (31). Los radicales libres del oxígeno (en particular el OH) presentan una gran avidez en la fijación a las bases púricas y pirimidínicas, alterando su estructura. Estos radicales libres junto a los productos de la lipoperoxidación producen daños importantes a nivel del DNA consistentes en:

1. Rotura y alteración de las bases por hidroxilación a través del peróxido de hidrógeno, por la reacción de Fenton. El OH, solo o en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puede provocar la rotura del DNA.
2. Producción de entrecruzamientos entre las bandas de DNA.

El daño oxidativo sobre el DNA, se puede producir de forma directa, como en el caso del *radical hidroxilo*, o bien de forma indirecta, a través de metales de transición, como es el caso del *peróxido de hidrógeno* (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y del *anión superóxido* (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en presencia de metales de transición, formándose como consecuencia *radical hidroxilo*. El daño indirecto sobre el DNA también puede ser mediado por *endonucleasas calciodependientes* (31). La producción de radicales libres cerca de las mitocondrias, con la consiguiente lesión del DNA mitocondrial y la pérdida de su capacidad de regeneración, se ha señalado como una de las causas más importantes del envejecimiento. Así, “el daño del DNA nuclear produciría cáncer, y el de las mitocondrias, envejecimiento”.

#### 5.2.16. Interacciones radicales libres y proteínas.

Los radicales libres pueden provocar en las proteínas *ataques difusos* tras la exposición a radiaciones ionizantes, ozono, o los secundarios a la cadena de propagación de radicales libres entre los que destaca la lipoperoxidación y la producción de entrecruzamiento catalítico por parte del malondialdehído (32), dando lugar a modificaciones generalizadas. Por otro lado, el daño oxidativo sobre las proteínas puede ocasionar ataques selectivos, con modificaciones en puntos específicos, siendo los aminoácidos lisina, histidina, arginina y prolina los más afectados. Estas modificaciones se conocen por “oxidaciones catalizadas por metales” y los enzimas que contienen metales de transición son los que tienen mayor riesgo de sufrir el daño oxidativo (33).

#### 5.2.17. Radicales libres y lípidos.

La peroxidación lipídica es un proceso autooxidativo iniciado por una variedad de radicales libres hacia los cuales son susceptibles los ácidos grasos presentes en la membrana (34). Este daño celular y/o tisular es iniciado por las especies activas del oxígeno, produciéndose seguidamente una cascada de radicales libres que dan lugar a la formación de peróxidos orgánicos y otros productos a partir de los ácidos grasos insaturados. El proceso de peroxidación conduce por tanto hacia la formación de LOO<sup>·</sup>, endoperoxidos e hidroperoxidos (35).

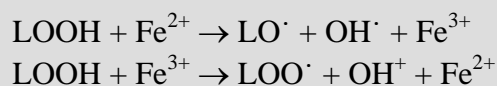
Los ácidos grasos más susceptibles de ser atacados por radicales libres son los que tienen mayor número de dobles enlaces, como el *linoleico* (C18:2n6), el *araquidónico* (C20:4n6) y el *docosahexaenoico* (C22:6n3); los ácidos grasos monoinsaturados (como el *ácido oleico*, C18:1n9) son relativamente resistentes, mientras que los saturados sólo son oxidantes bajo condiciones extremas (36).

Entre los productos finales de la peroxidación lipídica se encuentran los hidroperóxidos de ácidos grasos, metabolitos como los *aldehidos malondialdehido* (MAD) y *4-hidroxinonenal*, e hidrocarburos de cadena intermedia como el *pentano o el etano*.

En el proceso de lipoperoxidación podemos observar tres fases: iniciación, propagación y terminación.

**Iniciación:** Especies radicales con suficiente poder oxidativo sustraen un átomo de hidrógeno de un metilo de la cadena del ácido graso para dar lugar a un radical lipídico centrado en el carbono (15). Estos radicales centrados en el carbono reaccionan seguidamente con el oxígeno produciendo el radical lipídico peroxilo ( $\text{LOO}^\cdot$ ), el cual puede reaccionar con otros ácidos grasos comenzando una nueva cadena de oxidación y la formación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (36). La presencia de dobles enlaces en el ácido graso facilitará esta pérdida de hidrógeno, ya que el radical formado se estabiliza deslocalizando el electrón desapareado en los dobles enlaces adyacentes (36). Los metales iónicos de transición, como el hierro se consideran como los auténticos iniciadores de la peroxidación lipídica ya que parecen estar implicados en la génesis de este proceso.

**Propagación:** La propagación o iniciación secundaria, consiste en la activación de la peroxidación lipídica por un radical lipídico dando lugar a una cadena de reacciones autocatalíticas. Entre los factores que influyen en la longitud de esta cadena, se encuentran la proporción lípido:proteína existente en la membrana (cuanto mayor es la cantidad de proteínas mayor es la probabilidad de reacción de un radical), la composición de ácidos grasos de la misma, la concentración de oxígeno o la presencia de antioxidantes (15). Los peróxidos lipídicos son muy inestables en presencia de metales de transición como el hierro o el cobre, rompiéndose los hidroperóxidos lipídicos, con generación de radicales libres que inician a su vez nuevas cadenas de lipoperoxidación.



En la práctica es difícil distinguir la genuina iniciación por complejos metálicos y las reacciones dependientes de hidroperóxidos lipídicos preformados.

**Reacciones de terminación:** Se producen mediante interacciones radical-radical, en presencia de reactantes a concentraciones relativamente altas y tienen como finalidad teminar las cadenas de peroxidación mediante la formación de productos no radicales.

La lipoperoxidación tiene un fuerte efecto destructivo en los seres vivos, bien por ataque directo a las estructuras de la membrana o bien indirectamente, liberando productos reactivos (36). La lipoperoxidación afecta a las propiedades biofísicas de la membrana, produciendo descenso de fluidez a través de ésta, cambios en las propiedades de sus fases y disminución de su resistencia eléctrica. Algunos autores (37),

han observado un incremento en la rigidez de la bicapa fosfolipídica después de la peroxidación lipídica. Por otra parte, el entrecruzamiento catalítico causa restricción de la movilidad de las proteínas de membrana. Tanto la peroxidación lipídica como la fluidez de membrana se han implicado en procesos patológicos y patofisiológicos (38). Como resultado de estos ataques se alteraría la función principal de la membrana (incluidas mitocondrias y aparato de Golgi), la de actuar como barrera, produciéndose una pérdida de la homeostasis iónica por la inactivación de bombas responsables de mantener dicha homeostasis, y una destrucción del orden impuesto al metabolismo intracelular, cuyo resultado final es la lisis celular. Se sabe que diversos agentes son estabilizantes o protectores de las células y organelas de membrana debido a sus efectos inhibitorios sobre la peroxidación lipídica (39).

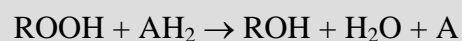
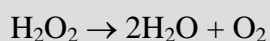
Los efectos indirectos de la peroxidación lipídica se deben por un lado a productos liberados biológicamente activos (como los productos carbonilos) que pueden difundir a un lugar distinto de donde se han producido. Por otro lado, otros productos quedan ligados a fosfolípidos manteniendo el proceso lesivo (36).

#### 5.2.18. Mecanismos antioxidantes.

El sistema de defensa contra el daño oxidativo provocado por los radicales libres está compuesto por múltiples antioxidantes con distintas funciones (Tabla 5.3), como la supresión de la generación de radicales, su atrapamiento y la reparación del daño producido. Este sistema de defensa está integrado tanto por enzimas que incluyen la *superóxido-dismutasa* (SOD) (citoplásmica y mitocondrial), la *catalasa* y el *ciclo redox del glutatión* (GSH) como por compuestos no enzimáticos de carácter hidrofílico o lipofílico.

Mecanismos enzimáticos:

a) *Catalasa*. Se trata de una enzima intracelular ferroporfirínica, ubicada principalmente en los peroxisomas (80%) y en el citosol (20%). Se considera a la catalasa como el antioxidante celular más importante. Esta enzima presenta una doble función *catalítica-peroxídica*, en cuanto que cataliza la descomposición de peróxidos de hidrógeno en agua y oxígeno y produce la oxidación de donadores de hidrógeno como el *metanol*, *etanol*, o los *fenoles* con consumo de peróxidos, como el  $H_2O_2$  y los *hidroperóxidos alquilo*.



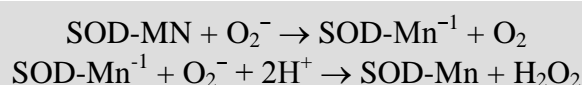
El predominio de una u otra reacción está en función de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de  $H_2O_2$  en el sistema. Entre las investigaciones realizadas a este respecto en el campo de la microbiología cabe destacar el estudio llevado a cabo por Archibald F.S. y col. (40), sobre la toxicidad del oxígeno y sistemas de defensa enzimáticos en la *Neisseria*, observando que la mayor tolerancia de *N. gonorrhoeae* al  $O_2^-$  extracelular y  $H_2O_2$  pareció ser debido a los muy altos niveles constitutivos de actividad peroxidasa y catalasa combinada con una impermeabilidad celular al  $O_2^-$ .



b) Superóxido dismutasa (SOD): Se trata de un grupo de metaloenzimas que juega un importante papel en el control de los niveles de  $O_2^-$  en los compartimentos celulares (41), ya que acelera la dismutación espontánea de  $O_2^-$  hacia  $H_2O_2$  y  $O_2$ .



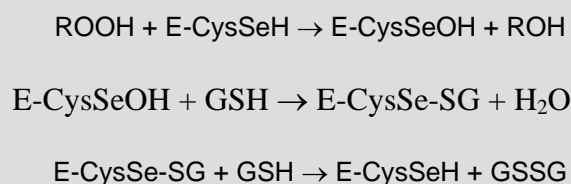
Según su localización en la célula y los metales que contienen, se pueden diferenciar tres grandes familias de SOD: las *superóxido dismutasas-cobre/cinc-dependientes* o citoplásmicas (Cu, Zn-SOD) y las *manganeso-dependientes* o mitocondriales (Mn-SOD) cuya localización es intracelular, y una intracelular (Esc-SOD) (41). Su mecanismo de acción se adapta a la siguiente ecuación:



c) Glutation peroxidasa: Incluye a una serie de enzimas que catalizan la reacción de hidroperóxidos con glutatión reducido (GSH), originándose *glutation disulfuro oxidado* (GSSG) y el producto de reducción, a *hidroperóxidos*.



Este enzima es crucial para la inactivación del peróxido de hidrógeno y de otros hidroperóxidos de cadena larga, encontrándose en los organismos vivos en dos grandes grupos: las GPX-selenio dependientes y las GPX-selenio independientes (42). El primer grupo contiene selenio en su centro activo, está localizado fundamentalmente en el citosol (70%) y en menor proporción en la mitocondria (30%) y presenta actividad frente a hidroperóxidos orgánicos y peróxido de hidrógeno, actuando según la siguiente ecuación:



Los enzimas selenio independientes que no requieren selenio para su actuación presentan una afinidad por peróxido de hidrógeno más reducida.

d) Glutation reductasa: La glutatión reductasa (G-R) cataliza la reducción de NADPH dependiente del glutatión disulfato oxidado (GSSG), reacción esencial para mantener los niveles de glutatión reducido (GSH).



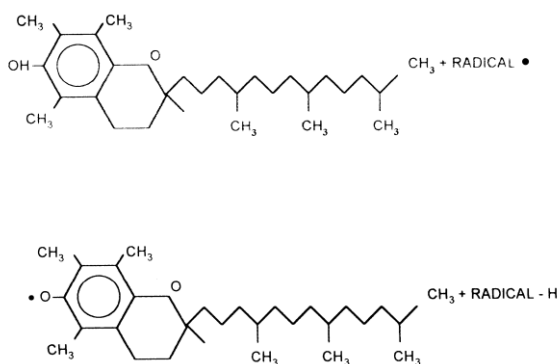
La presencia de GSH es clave en los procesos de óxido-reducción, actuando asimismo en los procesos de detoxicación y en otras funciones celulares de gran importancia (43). La actividad enzimática de la glutatión reductasa permite mantener un elevado balance entre GSH/GSSG, necesario para detoxificación de peróxido de hidrógeno (molécula muy permeable a través de la doble capa de fosfolípidos de las membranas celulares) y de otros agentes tóxicos.

Mecanismos antioxidantes no enzimáticos:

Entre ellos cabe citar las vitaminas E y C, los beta-carotenos, el ácido úrico, la ceruloplasmina, la transferrina, la taurina, quelantes de metales pesados, taninos, alcaloides de *Gingko Biloba*, selenio, lactoferrina, tioxantina, hidroxantina, y los ácidos nordihidroguayarático y tiazolidincarbóxilo, entre otros compuestos.

a) Vitamina E (*alfa-tocoferol*): Su estructura química es la de una molécula de *tolcol* (figura 5.3), constituida por un núcleo *hidroxicromona* al que se une una cadena de *fitilo*. Las ocho formas isoméricas existentes se dividen en dos grupos según la posición de los grupos metilo en el anillo, cuatro con una cadena saturada de fitilo (*alfa*, *beta*, *gamma* y *delta-tocoferol*) y cuatro con una cadena de fitilo con dobles enlaces en la posición 3', 7' y 11' (*alfa*-, *beta*-, *gamma*, y *delta-tocotrieno*).

Las formas isoméricas son las más activas del  $\alpha$ -tocoferol, al cual se le considera como el antioxidante soluble en lípidos más efectivo de la naturaleza (44).

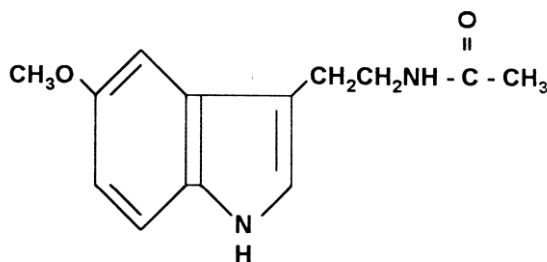


**Figura 5.3.** Esquema de la estructura de la vitamina E (imagen superior) y del radical fenoxilo (imagen inferior) formado tras la neutralización de un radical libre.

El resultado biológico presentado en la figura 3 es que radicales orgánicos reactivos son transformados en radicales menos reactivos. Esta reacción es efectiva inhibiendo la cadena de reacciones de peroxidación en moléculas de ácidos grasos poliinsaturados sobre membranas biológicas; este sustrato de la vitamina E con ser el más importante no es único, habiéndose descrito su efecto como eliminador de otros radicales como azida,  $\text{Br}_2^-$ , tiocianatos y varios radicales fenoxil; estas reacciones son independientes del pH.

b) Melatonina: La hormona melatonina (*N-acetil 5-metoxitriptamina*) es una molécula altamente evolucionada, presente en organismos tan diferentes como las algas o el ser humano, encontrándose compuestos estructuralmente relacionados en la práctica totalidad de los organismos (figura 5.4) (45). Aunque es sintetizada por un gran número de células y tejidos (46), su síntesis en los mamíferos se lleva a cabo fundamentalmente en la *glándula pineal* (47). En el ser humano, la glándula pineal se encuentra localizada en el centro del cerebro, detrás del tercer ventrículo y tiene dos tipos de células: los *pinealocitos*, que predominan y producen, tanto indolaminas (principalmente melatonina), como péptidos (arginina-vasotocina), y *células neuroglias*. La melatonina se sintetiza a partir de la *serotonina* y es catalizada por dos enzimas, la *arilalquilamina N-acetiltransferasa* y la *hidroxiindol-O-metiltransferasa*, que en gran parte se encuentra en la glándula pineal. La síntesis de melatonina se acopla a un ritmo circadiano, alcanzando sus máximos valores por la noche (48), con un pico entre las 2 y las 4 a.m., cayendo gradualmente durante la segunda mitad de la noche. Esta molécula está implicada en el control de diversas funciones fisiológicas esenciales, en relación con el sistema endocrino y los fenómenos de tipo circadiano y estacional, fundamentalmente. Parece que estas acciones de la melatonina están mediadas por receptores de membrana localizados en el núcleo supraquiasmático (SCN) y en la *pars tuberalis* de la hipófisis, respectivamente. Recientemente se han identificado diversas acciones relacionadas con la *respuesta inmune*, el *envejecimiento* (49), el *sistema nervioso*, la capacidad de *crecimiento tumoral* y se ha demostrado un efecto protector del daño sobre el DNA inducido por carcinógenos químicos (50); funciones todas ellas que se relacionarían con los primeros hallazgos sobre la potencial influencia de la melatonina sobre cualquier célula del organismo (51). Tanto los estudios *in vivo* como *in vitro* han mostrado que la melatonina es un potente neutralizador del altamente tóxico radical hidroxilo y otros radicales centrados en el oxígeno. Este proceso no requeriría ningún receptor específico, por lo que sería universal para todos los tipos celulares (52). Estos radicales originan el estrés oxidativo, pudiendo desembocar en la degeneración y muerte celular como ya se vió anteriormente.

El radical hidroxilo (HO) es uno de los mediadores mayormente involucrados en la toxicidad debido al oxígeno en los organismos (53), actuando sobre lípidos, ácidos nucleicos y proteínas. Por ello, es tan importante el papel que juegan los antioxidantes en todos los organismos, que al estar implicados en una gran variedad de vías metabólicas se erigen en protectores de los efectos dañinos de los radicales libres. A este respecto se ha señalado a la melatonina como un limpiador del altamente tóxico radical hidroxilo (HO), el radical peróxido (ROO $\cdot$ ) y el singlete de oxígeno ( $^1\text{O}_2$ ). A la acción protectora de esta molécula puede contribuir su capacidad para estabilizar membranas celulares (53), la cual se presume que es el resultado de su actividad de limpieza de radicales libres observándose así mismo su capacidad para reducir la peroxidación lipídica (54). En esta función de limpieza de radicales libres puede actuar sinérgicamente con otros antioxidantes conocidos, como las vitaminas C y E. La acción antioxidante de la melatonina incluye además, el efecto estimulante ejercido sobre las enzimas antioxidativas superóxido dismutasa (SOD) (45) y glutatión peroxidasa (GPX) (55). Esta variedad de funciones sumada a la alta solubilidad tanto en lípidos como en medio acuoso de esta molécula que la hace capaz de atravesar todas las membranas morfofisiológicas y penetrar en los compartimentos subcelulares, señalan a la melatonina como un factor de gran importancia en la defensa antioxidativa.



*Figura 5.4. Melatonina.*

La función de limpieza de radicales hidroxilo que ejerce la melatonina se basa en su estructura química. Así, el grupo metilo localizado en posición 5-OH del anillo indol es requerido para esta función, mientras que el grupo N-acetil actúa sinérgicamente. Entre los factores que incrementan la importante función de la melatonina como “barrendero” de radicales, figura su alta difusibilidad. En base a su carácter lipofílico, la melatonina atraviesa cualquier barrera morfofisiológica, incluida la barrera hematoencefálica. Es así como protege a las membranas celulares de la peroxidación lipídica, conservando a la vez la integridad mitocondrial en el citosol, así como al DNA mitocondrial y nuclear (51).

El grupo de estudio de la melatonina creado en nuestro país ha estudiado el funcionalismo de la glándula pineal en niños sanos de diferentes edades. En el periodo neonatal ya está presente un funcionamiento de la glándula, aunque aún no se ha puesto en marcha el ritmo circadiano en sus secreciones. En la etapa preescolar se evidencia un descenso en la secreción de melatonina conforme avanza la edad del niño, para experimentar un ligero incremento en la pubertad. El esclarecimiento del ritmo de producción de melatonina abre un campo amplísimo respecto a las posibilidades de administración clínica en Pediatría, con especial interés en procesos patológicos en los que predomine un estrés oxidativo con un exceso de producción de radicales libres (Sepsis, meningitis bacterianas, convulsiones intratables, etc.).

Se ha observado una influencia recíproca entre glándula pineal y sistema inmune, teniendo el sistema inmunitario capacidad de síntesis de melatonina a nivel pineal y en otros tejidos (56).

c) Tioles: Los tioles pueden reaccionar con los radicales tocoferilo y regenerar tocoferol; a su vez el tocoferol puede también reparar radicales tiol oxidados. El glutatión es el tiol más representativo de la célula, este compuesto independientemente de su efecto sobre los radicales tocoferilo puede por sí mismo inhibir la peroxidación (57).

### 5.3. Estructura bacteriana.

Las bacterias son microorganismos unicelulares incluidas dentro del grupo de las células procariotas (del griego procaryos, previo al núcleo). A diferencia de las células eucariotas (del griego eukaryos, núcleo verdadero), las bacterias carecen de membrana nuclear y orgánulos citoplásmicos especializados, su división se realiza por fisión

binaria y presentan a excepción de los micoplasmas, una estructura externa a la membrana celular, denominada pared celular.

Entre las estructuras que presentan las bacterias se encuentran un grupo de elementos fundamentales para la supervivencia bacteriana, de modo que su inexistencia las hace inviables o dificulta de forma importante su viabilidad. Éstos son conocidos como estructuras o elementos obligados. El resto de las estructuras corresponde a los elementos facultativos, y son aquellos de los que puede prescindir la bacteria para sobrevivir, aunque su presencia favorezca la viabilidad bacteriana. Éstos últimos pueden ser expresados por la bacteria en determinadas circunstancias o incluso no expresarlos en absoluto.

### 5.3.1.Elementos obligados.

Pared celular: Se trata de una estructura rígida, inmediatamente externa a la membrana citoplásmica. Entre sus funciones, se describen:

- a) Dar forma y rigidez a la bacteria.
- b) Protección de los elementos internos frente a factores adversos externos, fundamentalmente de los cambios de presión. Al ser la presión osmótica bacteriana mayor que la del medio externo, en ausencia de pared celular se podría producir la ruptura de la membrana celular.
- c) Es el lugar de actuación de diversos antibióticos ( betalactámicos, peptídicos).
- d) Poseen componentes que se comportan como potentes antígenos, originando la síntesis de anticuerpos específicos.
- e) Contiene determinantes de la patogenicidad (LPS, ácidos lipoteicoicos, etc).
- f) Es el lugar responsable de la tinción de Gram, ya que es la estructura que adquiere color, al ser teñido con distintos colorantes, permitiendo la clasificación de bacterias en grampositivas (violetas) y gramnegativas (rojas).

La pared celular de las bacterias grampositivas es gruesa y homogénea, unida íntimamente a la membrana citoplásmica, está integrada fundamentalmente por peptidoglicano o mureína y por ácidos teicoicos. El peptidoglicano está compuesto, en su parte glicídica por cadenas lineales de ácido N-acetil-murámico y N-acetil-glucosamina unidas por enlaces beta-1-4. La parte peptídica está compuesta por pequeñas cadenas de a.a. (alanina-ácido glutámico-lisina-alanina). Los ácidos teicoicos son polímeros de glicerol fosfato o ribitol, con restos de aminoácidos y azúcares ligados. Se hallan unidos al propio peptidoglicano o a los lípidos de la membrana citoplásmica, denominándose en este caso ácidos lipoteicoicos. Los ácidos teicoicos son los principales antígenos de las bacterias grampositivas (el polisacárido A de *S. aureus* es un ácido teicoico). Desempeñan además un importante papel en la adherencia a receptores, bien directamente (*S. aureus*) o asociado a proteínas y fimbrias (*Streptococcus pyógenes*).

La pared celular de las bacterias gramnegativas es más delgada y completa, consta de una membrana externa bilaminal y una capa de mureína que constituye el espacio periplásmico y que separa la membrana externa de la citoplásmica. La parte

externa de la membrana externa está constituida por un lipopolisacárido (LPS) que a su vez consta de tres partes: a) La porción superficial que constituye el denominado antígeno O ó somático (uno de los antígenos fundamentales de los gramnegativos). Las bacterias están en fase rugosa o lisa según pierdan o no el antígeno O. b) La capa intermedia constituye el “core” y es un antígeno de grupo. c) El área más interna o lípido A, es la endotoxina responsable del inicio del cuadro del shock séptico. Es menos antigénica que la parte polisacárida.

La capa interna de la membrana externa es un fosfolípido, similar a la membrana citoplasmática a la que se une en ocasiones mediante invaginaciones, denominadas uniones de Bayer. Entre la capa interna de la membrana externa y la membrana citoplasmática se encuentra el denominado periplasma o espacio periplásmico, inexistente en grampositivos y que contiene la capa de mureína, enzimas y proteínas de transporte implicadas en procesos metabólicos de la bacteria. Existen además, proteínas transmembrana implicadas en el aporte de nutrientes y otros elementos necesarios para la bacteria (porinas, proteínas integrales, lipoproteína de Braun).

Un caso particular lo constituyen las bacterias sin pared celular, incluidas en la clase *Mollicutes*, y entre las que destacan, como patógenos humanos, los géneros *Mycoplasma* y *Ureaplasma*. Son bacterias extremadamente frágiles en medios iso o hipotónicos, pleomórficas, gramnegativas e insensibles a los antimicrobianos que actúan sobre la pared.

Además, cuando se modifican las condiciones ambientales, determinadas bacterias pueden perder la pared, tanto *in vitro* como *in vivo*, transformándose en formas L. Estas formas tienen importancia por la posibilidad de que *in vivo*, condicionen fracasos terapéuticos o recidivas, con antimicrobianos que actúan sobre la pared.

**Membrana citoplasmática:** Es una estructura constante en todas las bacterias sin excepción. Se trata de una bicapa fosfolipídica en la que se intercalan diversos tipos de proteínas. Presenta además algunos glicolípidos. Tiene especial importancia la presencia en la cara externa, de las proteínas fijadoras de penicilina (PBPs) que intervienen en la síntesis del peptidoglicano, y son la “diana” de los antimicrobianos betalactámicos. Las más conocidas son las de *Escherichia coli*, en el que se han descrito ocho: 1 (1a, 1b), 2, 3, 4, 4', 5 y 6, con funciones diferentes cada una de ellas.

Entre las funciones de la membrana citoplásmica destacan:

- Es una barrera osmótica que junto con la pared forma una verdadera membrana funcional, donde se llevan a cabo mecanismos de transporte activo, en los cuales las proteínas facilitan el transporte a través de la membrana.
- Participa en la producción de energía en forma de ATP a partir de nutrientes. Es el lugar donde se sitúan los citocromos encargados de la fosforilación oxidativa.
- Interviene en la síntesis de elementos estructurales: Precursores de la pared celular, elementos de la cápsula, lípidos de la membrana y ADN.
- Es la localización inicial de proteínas sintetizadas para su excreción o incorporación a la célula.
- Interviene en la división celular mediante los mesosomas, separando los núcleos hijos y dividiendo la célula.

- Posee proteínas receptoras que actúan en la quimiotaxis.
- Es el lugar de acción de algunos antibióticos.

*Citoplasma bacteriano*: Es un material principalmente acuoso (compuesto por agua en un 85 %) que contiene además, ribosomas, inclusiones, mesosomas, el nucleoide, los plásmidos, principios inmediatos, minerales y enzimas. Carece de orgánulos cubiertos de membrana característico de las células eucariotas. Componentes:

- Ribosomas. Se visualizan con el microscopio electrónico. Suelen estar agrupados en 3-4 elementos unidos por un filamento de ARN mensajero, denominándose polirribosomas. Están compuestos por ARN y proteínas. Son los orgánulos donde se efectúa la síntesis proteica y constan de una subunidad mayor (50s) y una menor (30s), siendo el punto de acción de varios de los antimicrobianos (tetraciclinas, macrólidos, aminoglucósidos, cloranfenicol y lincosamidas).
- Inclusiones citoplásmicas. Son de naturaleza muy diversa, tratándose habitualmente de depósitos de reserva, aunque a veces obedecen a fenómenos degenerativos. Se distinguen dos grupos:
  - a. Vacuolas: aparecen en células viejas próximas a la lisis, y son acúmulos de líquidos o gases que se observan al microscopio electrónico como espacios vacíos que pierden su contenido tras el corte.
  - b. Granulaciones: Son inclusiones sólidas que suelen contener material de reserva y que pueden ser observadas con el microscopio óptico. Entre las inclusiones más importantes se encuentran: los gránulos de depósito de polisacáridos, las inclusiones de material lipídico, como el ácido Beta-hidroxi-butírico, gránulos de polifosfatos o volutina, gránulos de azufre, etc.

Genoma bacteriano: Constituido por moléculas de ADN cromosómico y extracromosómico. El ADN cromosómico es un elemento obligado y se encuentra enrollado o plegado formando un solo cromosoma circular y se identifica como el equivalente en la bacteria al núcleo de las eucariotas, llamado nucleoide o nucleoplasma. El ADN extracromosómico es un elemento facultativo, que no codifica elementos vitales para la célula, aunque sí puede codificar estructuras y sistemas que le sean de utilidad para su supervivencia en determinadas circunstancias. Se replica de forma autónoma del cromosómico y está constituido por plásmidos y bacteriófagos atemperados o lisogénicos (virus bacterianos no virulentos).

- a) Nucleoide bacteriano. Es el equivalente al núcleo en la célula eucariota, pero a diferencia de esta, carece de membrana nuclear, nucleolo y proteínas del tipo de las histonas y está constituido por un solo cromosoma. Está unido en uno o más puntos, a la membrana citoplásmica, situado en la zona central de la bacteria y tiene aspecto fibrilar. La replicación es idéntica a la de las células eucariotas, sirviendo cada cadena de molde para una complementaria nueva. La información genética del nucleoide se puede transferir de una bacteria a otra al pasar parte del cromosoma por transformación (a través

del medio), conjugación (arrastrado por un plásmido) o transducción (mediante un bacteriófago). Diversos antimicrobianos actúan en distintas etapas de la síntesis del cromosoma bacteriano.

- b) Plásmidos. Son moléculas de ADN bacteriano, circulares, que se replican y transmiten de unas células a otras, con independencia del resto de ADN existente en la célula. La transferencia la pueden llevar a cabo, bien de forma vertical (de célula madre a célula hija), bien de forma horizontal (a otras células). Esta última se puede realizar por transformación, transducción, conjugación o movilización. Cuando un plásmido posee genes que codifican su autotransferencia se denomina conjugativo, dando lugar a la formación de un pili sexual en bacterias gramnegativas, o a la síntesis de feromonas al contacto de las otras bacterias en el caso de grampositivas. Según las propiedades que confieren a las bacterias, los plásmidos se han agrupado en *plásmidos de resistencia (factores R)* que codifican la resistencia a los antimicrobianos, bien por inactivación enzimática, bien por modificaciones en el lugar de acción; *plásmidos conjugativos o factores sexuales* poseen la dotación genética para transferirse a otras bacterias, el más conocido es el factor F descrito en *Escherichia coli* K 12; *plásmidos de virulencia* que transmiten información que permite la síntesis de toxinas, pili u otros factores de patogenicidad. Tanto las enterotoxinas termolábiles, como los pili (factor de colonización) de *Escherichia coli* enterotoxigénicos están mediados por plásmidos. Por último, otros plásmidos codifican la producción de sustancias antimicrobianas y la realización de diversas funciones metabólicas.
- c) Transposones: Son fragmentos de ADN, integrados en alguno de los elementos del genoma bacteriano que tienen capacidad para autoreplicarse y desplazarse libremente entre cromosoma, plásmidos y fagos. Por esta propiedad se les ha llamado también elementos de transposición o genes saltarines. Pueden codificar propiedades como: la producción de enzimas y toxinas, o la resistencia a determinados antibióticos.

### 5.3.2. Elementos facultativos.

Son aquellos elementos presentes en algunas bacterias, no siempre de forma constante, no imprescindibles para la supervivencia y cuya expresión varía de unas a otras. Gran parte de estos elementos influyen de forma importante en la patogenicidad bacteriana como veremos más adelante.

**Glicocalix:** Es una cubierta externa a la pared celular de estructura homopolisacárida la mayoría de las veces, muy hidrófila, mal definida y delimitada, heterogénea en su densidad y grosor y poco ligada a la superficie bacteriana, lo cual le



confiere una gran facilidad para su eliminación. Recibe también el nombre de capa mucosa o *slime* y es sintetizada mediante enzimas presentes en la membrana citoplásmica.

Cumple una función especial para que la bacteria logre adherirse a superficies lisas no descamativas, como por ejemplo: dientes, huesos, válvulas cardíacas o materiales biológicos inertes (prótesis, lentes de contacto, sondas, catéteres vasculares...). Esta propiedad es aprovechada por el *S. mutans* para adherirse al diente y formar la placa de caries. Otra función del glicocalix es obtaculizar el contacto entre microorganismos y fagocitos, anticuerpos, enzimas y antibióticos, aportando de esta forma una buena protección a la bacteria.

**Cápsula:** A diferencia del glicocalix, es una estructura bien definida y fuertemente adherida a la superficie bacteriana que está presente con frecuencia tanto en bacterias grampositivas, como en gramnegativas (*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria meningitidis*). Para su demostración hay que recurrir a tinciones negativas como la tinción de tinta china, observándose la cápsula como un halo transparente que rodea a la bacteria contrastando con el fondo negro. Su observación también se puede llevar a cabo mediante reacciones serológicas. La *reacción de Neufeld* consiste en una modificación de la refringencia capsular, al enfrentarla con anticuerpos específicos que produce un efecto óptico de aumento de tamaño, conocida por este motivo, como *reacción de hinchazón de la cápsula o de Quellung*. Existen otros tipos de test serológicos, como aglutinación-latex o contraelectroforesis que pueden asimismo demostrar la existencia de la cápsula.

Las bacterias capsuladas, dan lugar a colonias de aspecto mucoso (M). Cuando pierden o carecen de cápsula su aspecto es liso (S), y si pierden el antígeno del LPS, las colonias adquieren un aspecto rugoso (R).

La cápsula cumple unas funciones determinadas entre las que cabe destacar:

- Dificulta la fagocitosis de los microorganismos que la poseen, impidiendo la fijación de las porciones Fab de los anticuerpos sobre las bacterias (acción antiopsonica) . Para que se produzca la fagocitosis es imprescindible la presencia de anticuerpos frente a la cápsula. En algunas bacterias como el *Streptococcus pneumoniae*, la cápsula constituye el principal factor de patogenicidad y su capacidad para producir o no enfermedad depende directamente de la presencia de cápsula. Las cepas capsuladas producen infección, mientras las no capsuladas son rápidamente fagocitadas y destruidas.
- En algunas bacterias, la cápsula impide que, componentes más internos activen el complemento por la vía alternativa, impidiendo de esta forma su destrucción por este mecanismo.
- La cápsula oculta los elementos antigénicos más superficiales de la pared (ácidos teicoicos, antígeno O), impidiendo la acción de los anticuerpos dirigidos contra ellos.
- Impide la penetración tanto de virus bacterianos como de la mayor parte de sustancias tóxicas hidrófobas, como detergentes.

- Dificulta la penetración de algunos antimicrobianos. Así, en la fibrosis quística, las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* que infectan al pulmón son muy resistentes a antibióticos por su gran cápsula.
- Protege a la bacteria de la desecación, debido a su alto contenido en agua.
- Puede actuar como una adhesina, permitiendo al microorganismo fijarse al hospedador.
- Es un elemento antigénico, conocido como antígeno capsular (en las enterobacterias se corresponde con el antígeno K). Esta antigenicidad se utiliza tanto a nivel diagnóstico (identificación, tipificación y diagnóstico serológico) como preventivo (elaboración de vacunas).

Flagelos: Son filamentos alargados finos, flexibles, ondulados y libres, de naturaleza proteica que se extienden hacia el exterior desde su anclaje en la membrana citoplásmica y la pared celular. Esta estructura permite la movilidad de la bacteria (grampositiva y gramnegativa) y su clasificación según la presencia o no de flagelos en: atricas si carecen de ellos; monotricas si presentan un solo flagelo (casi siempre polar); las lofotricas y anfitricas tienen un penacho de flagelos en uno o ambos extremos respectivamente; las peritricas están rodeadas de flagelos en toda la superficie bacteriana. Se ponen de manifiesto mediante la microscopía electrónica o con tinciones específicas que se depositan sobre el flagelo incrementando su grosor. La movilidad que proporcionan los flagelos es a través de un mecanismo de rotación del filamento libre sobre su punto de inserción en la envoltura bacteriana. La temperatura del medio influye sobre la movilidad de algunas bacterias, como la *Listeria monocytógenes*, que es móvil a 25° C y no a 37° C. Entre las funciones fundamentales de los flagelos se encuentran:

- Tienen un importante papel en la patogenia, facilitando la difusión de los microorganismos en distintas superficies, y su penetración en las capas mucosas.
- Desempeñan una función notoria en la quimiotaxis al facilitar el acercamiento de la bacteria hacia estímulos positivos, que las atraen, y el alejamiento de los negativos que las repelen.
- Al tratarse de estructuras proteicas, los flagelos son antigénicos (en las enterobacterias se denominan antígenos H), permitiendo el diagnóstico serológico y el serotipado de las cepas.

Algunas bacterias como la *Salmonella* spp. pueden producir flagelos que cambian de composición proteica y por tanto de antigenicidad. La reacción entre bacterias flageladas y los anticuerpos frente a estas estructuras se pone de manifiesto por aglutinación, produciéndose unos agregados grandes de aspecto algodonoso.

Fimbrias o pili: Son elementos alargados y rígidos, presentes en la superficie de algunas bacterias, morfológicamente similares a los flagelos pero más delgados y cortos, visibles solamente al microscopio electrónico y a diferencia de los flagelos no están implicados en la movilidad de la bacteria. Las poseen sobretudo las bacterias gramnegativas, aunque no de forma exclusiva. Estas estructuras tienen importancia en la patogenicidad, pues se adhieren al latex, hematies y glicocalix de los epitelios. Esta capacidad de adherencia se basa en su condición de adhesinas, constituyendo el primer paso de la colonización y de la infección. Así solo las cepas de gonococo que poseen fimbrias son capaces de adherirse a las células de la mucosa uretral y producir infección. Las fimbrias al ser estructuras de naturaleza proteica tienen propiedades antigénicas, lo cual puede ser aprovechado para la preparación de vacunas. Algunas

bacterias, como la *Neisseria gonorrhoeae*, cambian los antígenos de sus fimbrias variando de esta forma la antigenicidad. En *Neisseria meningitidis* se puede distinguir una etapa inicial de adherencia mediada por pili; posteriormente la *N. meningitidis* se dispersa y pierde la piliación, produciéndose una adherencia difusa. En esta etapa, las microvellosidades han desaparecido, y *N. meningitidis* interacciona íntimamente con las células. La progresión desde la adherencia localizada a la difusa requiere el producto del gen PilT (proteína Pil T). Una mutación en dicha proteína incrementaría la piliación y suprimiría la fase dispersa de este grupo bacteriano. La fase inicial de la adherencia localizada mediada por pili es necesaria para que ocurra la adherencia difusa, la pérdida de microvellosidades y la unión íntima, ya que las bacterias no piliadas son incapaces de tal interacción celular.

Las fimbrias pueden poseer además, propiedades antifagocitarias. Se distinguen dos tipos de fimbrias: a) comunes, más relacionadas con la adherencia y b) sexuales, frecuentemente codificadas por plásmidos, suelen ser menos numerosas y de mayor longitud, e intervienen en la conjugación bacteriana.

Esporas, endosporas o esporos: Son formas de resistencia desarrolladas por algunas bacterias para defenderse ante circunstancias adversas que puedan poner en peligro su supervivencia (variaciones en la temperatura, en el pH, escasez de nutrientes...). sólo se han encontrado en bacterias grampositivas (con alguna excepción como *Coxiella burnetti*). Su situación en el soma bacteriano puede ser central, subterminal o terminal, lo cual puede ser útil en la identificación del microorganismo.

## 5.4. Consideraciones sobre patogenicidad bacteriana

### 5.4.1. Prerrequisitos para la virulencia.

La capacidad de las bacterias para unirse y crecer sobre casi cualquier superficie es conocida desde hace décadas. La importancia que el fenómeno de la adherencia adquiere en la colonización de sustratos específicos y su importante papel en la patogénesis de las infecciones bacterianas tanto en el hombre como en los animales ha sido muy estudiada en los últimos años (58).

Consideramos de interés, en primer lugar, definir la terminología básica que emplearemos a lo largo de este tema. La virulencia, definida como el grado de agresividad de un microorganismo patógeno, es una condición muy variable incluso entre las razas pertenecientes a una misma especie o entre cepas de la misma raza; el grado de virulencia oscila según las condiciones en que se encuentren los microorganismos. Por lo general, un microorganismo patógeno se hace menos virulento al pasar de un medio natural a un medio de cultivo artificial, denominándosele entonces atenuado, observándose el mismo efecto en condiciones desfavorables del ambiente. La virulencia de un microorganismo puede ser reducida, bien por el empleo de determinados medios de cultivo, o bien recurriendo a su pase por animales. Numerosos estudios vienen a apoyar este hecho; E. Horská y col. (59), observó que tres cepas bacterianas distintas de *pseudomona* fueron capaces de cambiar las cargas de superficie y la hidrofobicidad de la membrana externa, propiedades inherentes a la virulencia, debido a la adaptación del sustrato. En concreto, el virus de la vacuna es un ejemplo de reducción de la virulencia para el hombre, a través de su cultivo por tejidos de vaca o

ternera. Por el contrario, un microorganismo atenuado puede adquirir mayor virulencia mediante su pase previo por determinadas especies animales; concretamente, la virulencia del neumococo se ve aumentada después de su pase por ratones (58).

*N. meningitidis*, cuando se cultiva en medioambiente con restricción de hierro, sintetiza nuevas proteínas de membrana externa, muchas de las cuales son necesarias para su supervivencia. Algunas de estas proteínas, por ejemplo, la proteína 1 y 2 ligadas a transferrina (Tbp 1 y Tbp 2) son ejemplos de importantes antígenos de superficie meningocócicos regulados por el hierro, los cuales no son expresados después del cultivo en medios comunes de laboratorio (60). Los resultados de este trabajo subrayan la importancia de estas proteínas y su conveniencia de ser consideradas en el desarrollo de las vacunas efectivas contra el meningococo serogrupo B.

La proximidad y la toxina Shiga 2 (Stx2) son factores de virulencia de las cepas de *Escherichia coli* productoras de toxina Shiga (STEC) que se han relacionado de forma importante con enfermedades en humanos, y particularmente con enfermedades graves (61).

Un factor que en cierto modo define la capacidad de una bacteria para producir enfermedad, es su vía de entrada en el organismo. Por ejemplo, se sabe que el microorganismo responsable de la gangrena gaseosa puede ocasionar una infección mortal si es frotado sobre la piel dañada, en tanto que ingerido resulta inofensivo; del mismo modo, el microorganismo de la fiebre tifoidea no causa infección al frotarlo sobre la piel, pero ingerido llega al intestino y produce la enfermedad. Esto y otros aspectos que trataremos a continuación nos sugieren una clara afinidad de los microorganismos hacia determinados tejidos (58).

Como decíamos, las bacterias han de introducirse en el organismo por la vía en que están adaptadas a penetrar, aunque no parece ser éste el único factor que decide el inicio del proceso infeccioso, ya que existen otros factores dependientes de los diferentes mecanismos de defensa, capaces de eliminar a las bacterias invasoras y que, por consiguiente, defienden al huésped de los microorganismos patógenos.

Los trabajos de Gibbons (58), demuestran claramente la alta afinidad de *Streptococcus mutans* hacia la placa dental y de *Streptococcus salivarius* hacia las células epiteliales de la cavidad oral. La relación existente entre el poder patógeno de la bacteria y la capacidad del tejido para fijarla son dos factores de gran importancia para el desarrollo de la enfermedad. Experiencias realizadas por Sellwood y col. (62), con cepas de *Echerichia coli* K-88 positivas demostraron la existencia de cerdos genéticamente resistentes a la infección por estas cepas y que este rasgo se hereda como un factor mendeliano simple de carácter dominante. Los ensayos realizados en cultivos de células intestinales procedentes de cerdos resistentes a la infección por cepas de *Echerichia coli* K-88 positivas pusieron de manifiesto la incapacidad de dichas cepas para adherirse a los bordes en cepillo de la mucosa intestinal. Otros estudios parecen indicar la ausencia de una fracción glicolípida en la mucosa intestinal de los cerdos resistentes a las cepas de *Echerichia coli* K-88 positivas (63). Por otra parte, los trabajos de Smith y Huggins (64), mostraron que estos mismos animales eran notoriamente sensibles a la infección por cepas de *Echerichia coli* que presentaban un factor de adhesión diferente, el 987 P. En cualquier caso, la infección siempre se ve favorecida cuando los mecanismos locales de defensa se ven neutralizados o dañados.

Una vez producida la infección primaria de un tejido por un microorganismo, puede tener lugar la extensión y colonización a los tejidos circundantes, beneficiándose este proceso de los mecanismos de dispersión habituales en el aparato o tejido en cuestión, tales como: acción de la gravedad, estornudo, tos, etc... Posteriormente tendrá lugar la colonización y extensión subepitelial del germen, en cierto modo neutralizada por la presencia a este nivel del tejido conectivo matriz. En cualquier caso, ciertas especies bacterianas han salvado esta barrera liberando sustancias como la hialuronidasa que favorece la penetración bacteriana tras inducir la digestión del ácido hialurónico, componente esencial del colágeno. Otros factores importantes en la patogénesis bacteriana serían: coagulasas, lecitinasas, etc..., así como la producción de lipasas y proteasas (65).

Durante el curso de la infección algunas bacterias penetran de forma regular en las células epiteliales. El modo en que los microorganismos logran acceder a ellas no es bien conocido aunque, en concreto, los microorganismos de los géneros *Shigella* y *Yersinia* provocan una ruptura local de la membrana citoplasmática, ocasionando la muerte a la célula, en tanto que otros microorganismos como la *Salmonella* no ocasionan necesariamente la muerte celular. En la salmonelosis, el resultado es una invasión de los tejidos profundos en la que no se produce necrosis del epitelio (65).

El paso de los microorganismos a través de la capa epitelial no es un fenómeno pasivo. Los microorganismos, tras salvar el primer obstáculo, constituido por el epitelio superficial, se ven expuestos a los diferentes mecanismos de defensa del huésped de los que el más importante es la respuesta inflamatoria. En el curso de la misma hay una dilatación de los vasos sanguíneos, incrementándose su permeabilidad y permitiendo así que diversos factores del suero (inmunoglobulinas y otras proteínas) entren en contacto con el agente infeccioso. Por otra parte, la activación del fibrinógeno a fibrina retarda la difusión de los microorganismos.

El fenómeno conocido como fagocitosis corresponde a la primera línea de defensa que el organismo posee frente a la infección (66). Por supuesto, no todos los microorganismos son destruidos por los fagocitos. De hecho el interior celular puede proporcionar un medio protector para microorganismos como estafilococos, el cual les permite evitar a los anticuerpos circulantes, favoreciéndose de esta forma la multiplicación. Algunas bacterias muy patógenas son capaces de matar a los neutrófilos después de un contacto muy breve o tras la fagocitosis.

#### 5.4.2 Factores antifagocitarios.

Las bacterias, en su mayoría, presentan su superficie rodeada de un material amorfo, al que numerosos autores se han referido como “glycocalix”, constituido por fibras de glicosaminoglicanos distribuidas densamente y cuyo carácter aniónico permite a los microorganismos atraer nutrientes y cationes. Su función parece relacionarse con la defensa frente a ciertos virus, fagocitos y algunos factores humorales, facilitando por otra parte a las bacterias, la adhesión a las superficies epiteliales del huésped. Se trata de algo similar a lo observado en *Streptococcus pyógenes*, en el que la proteína “M” (de superficie) le permite adherirse a las células epiteliales y es determinante de su virulencia. Beachey y col. (67), sugiere que en dicho microorganismo la unión de los ácidos lipoteicoicos a las superficies epiteliales tiene un papel importante en la fase inicial de algunos procesos infecciosos. En estos gérmenes la adhesión ha sido exhaustivamente estudiada y parece dependiente del ácido lipoteicoico y la proteína “M”. La capacidad de organismos bacterianos para producir una matriz polisacárida extracelular conocida como *slime* se ha relacionado con el aumento de virulencia e infecciones retardadas en diferentes implantes protésicos. Este *slime* puede proteger a la bacteria de los mecanismos de defensa del huésped, especialmente la fagocitosis por los linfocitos polimorfonucleares (68). Los resultados extraídos de los trabajos de estos autores al comparar el *S. epidermidis* RP62A productor de *slime* y su variante fenotípica, RP62A-NA no productora de *slime*, muestran que tanto la fagocitosis, como la adherencia y la producción de superóxido, se incrementan en RP62A, mientras que el descenso de la hidrofobicidad de RP62A sobre RP62A-NA se correlacionó con una capa hidrofílica de *slime*. Estas y otras investigaciones demuestran la importancia de los componentes de superficie de las bacterias en los procesos de adhesión, directamente implicados en la fagocitosis.

Los pili o fimbrias, como veremos más adelante han sido extensamente estudiados en gérmenes gram negativos y parecen ser los responsables de la relativa resistencia a la fagocitosis que presentan algunas bacterias tras asociarse a determinados tejidos (64), quizás debido a una saturación en la unión de los pili activos con los receptores de las células epiteliales, imposibilitando de este modo o al menos disminuyendo su interacción con células fagocitarias. Datos extraídos de un estudio de Nayto Y y cols. (71), sobre cepas invasivas y no invasivas de *Porphyromonas gingivalis*, sugieren el importante papel que juegan las fimbrias en la colonización a través de su actividad hidrofóbica, demostrando de igual forma que las fimbrias de las cepas no invasivas están relacionadas con la mayor adhesión para la unión al tejido gingival, mientras las fimbrias de las cepas invasivas están débilmente involucradas en la adherencia.

Se sabe que muchas bacterias se adhieren a la fibronectina (matrix proteica que se detecta en el fluido vaginal en la mujer en trabajo de parto) estableciendo así un primer paso de infección. En la mujer en trabajo de parto los *Streptococcus del grupo B* son agentes comunes de corioamnionitis (72). Estos mismos autores en un trabajo llevado a cabo sobre 57 cepas de Streptococo del grupo B aisladas de mujeres con rotura prematura de membranas, observan que la hidrofobicidad de superficie celular es un factor de adhesión inespecífico en dicho germen, así como que la unión a fibronectina es un factor de adherencia adicional en algunas de las cepas y puede ser asumido que juega un papel principal en el establecimiento del proceso infeccioso.

Otro tipo de acción antifagocítica se da en gérmenes como el bacilo de la tuberculosis, el bacilo de la lepra y los microorganismos del género *Brucella*, que presentan ciertas características en la composición de su superficie que les permiten sobrevivir en el interior de los fagocitos y macrófagos y les confieren capacidad para resistir el efecto de los enzimas lisosómicos (65).

#### 5.4.3. Catabolitos bacterianos.

La producción de catabolitos por las bacterias es ejemplo de un factor lesivo determinante de la virulencia y dependiente de una herencia de tipo poligénico (64). La formación de este tipo de compuestos, como las aminas, indol, escatol, fenol y sulfuro de hidrógeno, en algunos casos depende de la existencia en el medio de cultivo de aminoácidos específicos que actúan como precursores. Por el contrario, en otros casos, la composición del medio de cultivo influye únicamente en el ritmo de formación de los catabolitos, siendo una propiedad inherente a los propios microorganismos su producción o no. Este sería el caso de las auténticas toxinas bacterianas: exotoxinas y endotoxinas (65).

Las toxinas de secreción o exotoxinas son liberadas al medio como resultado del crecimiento bacteriano. Por lo general, es necesario una alta concentración de estas sustancias para que el crecimiento del germen se vea afectado, pero basta una cantidad ínfima de toxina para provocar el efecto tóxico en el huésped. Por lo tanto, en el proceso de colonización de los tejidos, además del daño físico producido por efecto del continuo crecimiento bacteriano, hay que considerar un daño de tipo químico dependiente de la producción de este tipo de sustancias. Algunas de estas sustancias actúan uniéndose a determinadas proteínas y produciendo efectos diversos: actuando sobre la ribosilación del ADP en el caso de la toxina colérica o sobre la síntesis proteica en el caso de la toxina diftérica (73).

Por su parte, las endotoxinas quedan libres en el interior del huésped al destruirse la bacteria por autólisis o ruptura mecánica por lo que su liberación al exterior presupone la muerte del microorganismo. La mayor parte de estas endotoxinas están compuestas de proteínas, aunque algunas parecen ser compuestos de carbohidratos y lípidos. Son débilmente antigénicas, termoestables a temperaturas de 60°C, no se alteran por la exposición a la luz ultravioleta y por lo general son resistentes a la acción de las enzimas proteolíticas.

#### 5.4.4. Adhesión bacteriana y patogénesis.

La adhesión de las bacterias a las superficies epiteliales es un primer paso esencial en la colonización de los hábitats microbiológicos (74). Se puede considerar la adherencia como el fenómeno resultante de la interacción entre dos superficies en el que participan factores físico-químico y biológicos, siendo necesario para que se produzca, el contacto de la bacteria con la célula (75). Algunos estudios resaltan la mayor capacidad de unión de las células epiteliales de pacientes con infecciones graves a bacterias patógenas (76;77). Por lo tanto, la interacción entre bacterias y células epiteliales es un elemento decisivo en el proceso patogénico, aunque esta interacción adhesiva se refiera en algunos casos también a gérmenes comensales y no sólo a patógenos. En particular, la capacidad de *P. gingivalis* para adherirse a la superficie oral

es el factor infectivo más importante, ya que la adherencia es el primer paso esencial en la colonización (78).

Por otra parte, es un mecanismo por el que los microorganismos pueden resistir el efecto de los procesos fisiológicos de limpieza, que tienden a impedir el asentamiento de los agentes infecciosos. Sin embargo, algunos autores (78-83), muestran como la adhesividad de la bacteria al epitelio no es toda ventaja para la misma y detrimento para el huésped, pues inmediatamente después de invadir el torrente sanguíneo, la presencia sobre la superficie de los microorganismos de adhesinas ejercería una acción beneficiosa para el huésped, ya que facilita su fagocitosis y posterior destrucción, debiendo desarrollar el microorganismo diversos mecanismos antifagocíticos, tales como la capsulación para evitar la unión a células fagocíticas (75). En el caso de *Escherichia coli*, algunas adhesinas relacionadas con la patogenicidad extraintestinal pueden estar involucradas en el incremento de la persistencia de *Escherichia coli* en su hábitat normal, el intestino grueso; las adhesinas que median la adherencia en las células epiteliales intestinales, especialmente P fimbrias, favorecen la persistencia de *Escherichia coli* en el intestino grueso de los niños (84).

Por todo ello, parece importante conocer la capacidad de adherencia del microorganismo, ya sea comensal o patógeno, a las superficies mucosas y su interacción con las células fagocitarias. Existen dos etapas claramente diferenciadas en la adhesión de los microorganismos a las superficies: el “proceso de adhesión” que puede ser definido en base a la afinidad de la adhesión de las bacterias a las superficies epiteliales, descrito según las ecuaciones de Michaelis-Menten. El punto máximo de adhesión (y afinidad) puede ser determinado gráficamente mediante las ecuaciones de Lineaweaver-Burk según modelos experimentales simples (85;86). Esta primera fase sería un proceso de tipo reversible en el que las fuerzas de Van der Waals ocuparían un lugar preponderante. El “estado de adherencia” claramente diferenciado del anterior sería irreversible y mediado por la síntesis de material polimérico. Las fuerzas que contribuyen al estado de adherencia son poco conocidas y quizás no se trate solo de interacciones entre receptores de células eucariotas y factores adherentes bacterianos; habría también que tener en cuenta otros sucesos secundarios en el proceso, como la excreción de material polisacárido (87-88). Los estudios diseñados por Cantey y col. (88), en base a las observaciones mediante microscopía electrónica, proporcionan evidencias morfológicas de la existencia de al menos dos estadios en la interacción adhesiva, lo que ratifica lo expuesto anteriormente.

Las bacterias adherentes pueden presentar una superficie en cierto modo diferente a las de las bacterias no adherentes. Por otro lado, las bacterias adherentes parecen ser menos sensibles a los antibióticos (89) y a los sistemas naturales de defensa del huésped como son la actividad bacteriana del suero y a la fagocitosis (90). Se ha demostrado que la adhesión de las bacterias Gram negativas está, en la mayoría de los casos, mediada por apéndices bacterianos accesorios: fimbrias o pili, mientras que la adhesión de bacterias Gram positivas parece depender de mecanismos diferentes a los anteriormente nombrados (91). Los pili tipo 4 de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* constituyen la clave determinante para la adherencia de estos patógenos a las células endoteliales y epiteliales (92). Bajo condiciones naturales, los pili representan el único medio para que la *N. meningitidis* capsulada se adhiera a las superficies mucosas humanas (93). Así mismo, los pili han demostrado ser esenciales para el establecimiento de infecciones experimentales por *N. gonorrhoeae* (94).



Es importante resaltar, como ya hemos indicado anteriormente, la existencia de componentes de superficie específicos, tanto en la bacteria como en la célula huésped, que intervienen en la adhesión. Ejemplos ya clásicos son la afinidad del Streptococo del grupo A por el epitelio faríngeo, del gonococo por el epitelio uretral y cervical y de los *Escherichia coli* enteropatógenos por el epitelio intestinal. Concretamente, la superficie del Streptococo grupo A presenta al microscopio electrónico finas proyecciones o fimbrias de superficie, que portan un antígeno específico, la proteína “M” a la que ya hemos hecho mención anteriormente (95).

Interesantes estudios realizados por McGee y col. (96), resaltan la importancia de las fimbrias gonococales en la colonización y destrucción celular en cultivos de células de trompa de falopio humana. Estos ensayos demostraron que tanto los gonococos fimbriados como los no fimbriados se unen a células epiteliales, si bien son los primeros los que producen destrucción celular de forma más rápida, siendo ésta mediada por uno o más factores tóxicos, como serían los lipopolisacáridos de superficie.

Los pili tipo 4, estructuras proteicas asociadas a la superficie, han sido implicadas en la mediación de la adherencia de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* a las células epiteliales (97).

Los pili de *Escherichia coli*, estudiados con detalle consisten en subunidades proteicas que tendrían una importante función en la interacción con carbohidratos específicos de superficie en las células eucariotas, incluyéndose algunos de ellos entre los antígenos “K”. Una de estas estructuras antigénicas es el antígeno K-88, que presenta una especial afinidad por el epitelio intestinal de cerdos. El K-99, similar al anterior es más afín hacia la mucosa intestinal de corderos y vacas, aunque puede también encontrarse ocasionalmente en cepas aisladas de cerdos (98). Los grupos antigénicos de adherencia CFA/I y CFA/II son los equivalentes a los anteriores en el hombre. La expresión de los factores K-88 y enterotóxico (ENT) son necesarios para conceder al microorganismo un papel patogénico; estos factores se encuentran codificados en plásmidos independientes, de forma que las variantes K-88 positivas y ENT negativas o K-88 negativas y ENT positivas son apatogénicas, aunque la primera se multiplica profusamente en el intestino. Por el contrario, las cepas con ambos plásmidos colonizan el intestino de cerdo produciendo diarrea.

Las fimbrias de *Echerichia coli* pueden ser diferenciadas según el peso molecular de sus subunidades, su composición de aminoácidos o por la especificidad de su enlace con las diferentes células eucariotas (99). El hecho de que el alfa-monósido inhiba la adhesión “in vitro” de bacterias que poseen fimbrias tipo-1 a la superficie de células eucariotas que contienen residuos de manosa (100), hace pensar en una adhesión indiscriminada de este tipo de bacterias a determinados tejidos, ya que las cadenas de oligosacáridos que contienen manosa son un rasgo muy frecuente en las oligoproteínas de la superficie de las células, incluyendo a las fagocitarias. En un estudio llevado a cabo recientemente (101), se observó que las colonias fluorescentes cubiertas con pili preparadas con tipos salvajes de *N. gonorrhoeae* piliadas se adhirieron a células endoteliales y epiteliales en contraste con las colonias procedentes de una mutante deficiente en PilC, quedando así demostrada la implicación de esta proteína en la adherencia a pili de ambos tipos de células; la proteína Pile u otras proteínas de pili pueden influir en el reconocimiento del receptor de PilC.

Algunas bacterias producen la enfermedad por penetración a través de las células del huésped, introduciéndose en algunos casos en las cavidades corporales y tejidos no accesibles para ellas desde el exterior. Así, *Shigella flexneri* se ubica entre las células epiteliales y las células de la lámina propia del intestino donde provoca destrucción de los tejidos circundantes, dando lugar a la disentería bacilar (102). Del mismo modo, la adhesión de *Vibrio cholerae* al intestino humano juega un papel importante en la patogénesis del cólera. Estos microorganismos muestran una acentuada quimiotaxis hacia los productos de degradación del mucus, penetrando activamente la capa mucosa superficial del intestino (103). Los componentes de superficie que participan en la interacción con las células epiteliales del intestino no son del todo conocidos, aunque se sabe que algunas cepas del biotipo El-Tor producen una hemaglutinina colérica que se considera como un probable factor de adhesión a la mucosa intestinal, reconociendo receptores específicos del intestino delgado y promoviendo la absorción del microorganismo a ellos. Existen también mecanismos de adherencia no asociados a pili o fimbrias en las bacterias, que les permiten colonizar las superficies celulares. Una capa no fimbriada de *Shigella flexneri* puede adherirse a células epiteliales de intestino de ratón a través de la interacción con residuos de fucosa y glucosa, mediada por un lipopolisacárido de la pared bacteriana (104). La preincubación de la bacteria con azúcares inhibidores no produce variación en su adhesividad, en tanto el pretratamiento de las células con los carbohidratos es eficaz para evitar la adhesión, lo que indica que son estructuras de superficie de las células las que reconocen los radicales de fucosa y glucosa en los lipopolisacáridos de la bacteria.

Como se ha expresado anteriormente, la adhesión de *Ps. multocida* a monocitos de sangre periférica del pavo está mediada por ácido hialurónico capsular. El reconocimiento de la cápsula de mucopolisacáridos es debido a isoformas monocíticas CD44 presentes en los monocitos de sangre periférica del pavo (69). Recientemente los CD44 han sido descritos como un receptor para la adherencia del *Streptococcus* del grupo A (105), pero es ahora cuando se ha descrito por primera vez a los CD44 como un receptor para la adherencia de bacterias gram negativas. El reconocimiento de CD44 en la membrana glicoproteica implicada en las interacciones célula-matrix puede ser usada por *Ps. multocida* para invadir los tejidos del huésped.

Como se deduce de estudios realizados por Jann (106), en *Echerichia coli*, pueden encontrarse insertos en la membrana componentes similares a los que habitualmente forman las fimbrias y que pudieran ser responsables de la adherencia de estos microorganismos en ausencia de piliación. En los *mycoplasmas* existen adhesinas no fimbriales en la superficie de sus membranas que reconocen estructuras receptoras portadoras de ácidos siálicos en las células (107).

Finalmente, Van Wamel W.J.B. y cols. (74), realiza un estudio con cepas de *Stafilococcus aureus* meticilin-resistentes (MRSA) dividiéndolas en dos grupos según su comportamiento epidemiológico, cepas MRSA epidémicas (EMRSA) y cepas MRSA esporádicas (SMRSA), encontrando que las diferencias en la resistencia a antibióticos, deshidratación u otros factores de supervivencia pueden jugar un papel en la capacidad para causar una epidemia. Como la adherencia se cree que es el primer paso en la colonización, la capacidad para causar una epidemia se podría explicar por la capacidad de un organismo para adherirse a una superficie. Además de las diferencias de adherencia entre estos dos grupos de MRSA, estos autores estudiaron la influencia de las condiciones de cultivo (medios de cultivo, T<sup>a</sup> de crecimiento y fase de crecimiento

de la bacteria) sobre la adherencia de cepas de SMRSA y EMRSA al plástico, colágeno I humano (HuCol I) y células Detroit 562 de carcinoma faríngeo (D562), concluyendo que dichas condiciones de cultivo influían en la adherencia al plástico, aunque fue observada alguna excepción.

#### 5.4.5. Genética de la adhesión bacteriana: codificación de estructuras de superficie por plásmidos de resistencia.

La adhesión bacteriana a superficies mucosas parece estar mediada por estructuras de superficie, resultantes de la expresión del material genético. Por regla general, las fimbrias somáticas tipo-1 son codificadas por genes cromosómicos y se presentan tanto en gérmenes comensales como en cepas patógenas de *Echerichia coli*; en tanto que los factores de adhesión que más frecuentemente se relacionan con la patogenicidad suelen ser codificados por plásmidos (108), aunque podrían serlo cromosómicamente. Los apéndices de la superficie bacteriana relacionados con las funciones de asociación se han denominado de forma general “fimbrias”, reservándose el término “pili” para todos aquellos casos en que su presencia se relaciona con el intercambio del material genético entre microorganismos. Se trata por tanto, de fimbrias sexuales o conjuntivas.

Dentro del grupo de estructuras denominadas de forma genérica adhesinas incluiríamos a los antígenos de superficie. Los antígenos más frecuentes son el O, H y K. El antígeno somático O está compuesto por complejos de lipopolisacáridos, que forman parte de la membrana externa de la bacteria.

Los genes para los factores bacterianos de adhesión más estudiados tales como el K-88, K-99 y CFA/I han sido localizados en plásmidos. De entre ellos se sabe que los genes para el factor K-88 representan una longitud total de 75 a 135 Kb, y frecuentemente van asociados a genes para la fermentación de rafinosa. El tamaño del gen para el factor CFA/I posee un tamaño aproximado de 90 Kb, y está unido a un gen para una enterotoxina estable (109).

Para el factor de adhesión K-88 se han identificado tres plásmidos responsables de las tres variantes antigénicas conocidas: K-88ab, K-88ac y K-88ad. Mooi y col. (110), diseñaron experimentos encaminados a determinar qué genes de la cadena plasmídica eran responsables de la formación del factor K-88 en cada una de las variantes. Para ello, dirigieron cada uno de los tres plásmidos K-88 con enzimas de restricción y los fragmentos obtenidos de cada uno de ellos fueron clonados mediante su inclusión en el vector PBR-322, identificando posteriormente los clones bacterianos que portan cada uno de los antígenos K-88. De esta forma, pudieron observar que la expresión del factor K-88 depende de la orientación de la cadena de DNA responsable y de la variante de que se trate. En el caso del K-88ab su inserción en el vector PBR-322 en un sentido o en otro modifica la cantidad de antígeno expresada.

En otros experimentos genéticos se ha puesto en evidencia cómo la virulencia puede depender de una multiplicidad de genes. Los organismos del género *Shigella* que penetran y colonizan las células de la lámina propia del intestino fueron objeto de un estudio en el que se trató de averiguar qué fragmento cromosómico era el responsable de su virulencia. Formal y Hornick (111), realizaron experiencias con *Shigella* en las

cuales reemplazaron fragmentos cromosómicos de este microorganismo por otros de *Escherichia coli*, observando que en algunos casos y dependiendo del lugar de inserción del fragmento de cromosoma de *Escherichia coli* se producía una pérdida de virulencia. Dado que esto ocurría al sustituir los genes de varios puntos distintos del cromosoma de *Shigella*, llegaron a la conclusión de que no es solo uno el gen responsable de la virulencia, al menos en estos microorganismos.

**Tabla 5.3.** Caracteres de algunas fimbrias que median la adherencia.

Adhesina Fimbria	Serotipo F	Origen de la cepa	Genes	Receptor (inhibidor Adherencia)	Aglutinación
Manosa-sensibles Tipo 1	F <sub>1</sub>	Ubicuo	Cromosoma	Glicoproteínas D-Manosa	Hematíes de cobayo, caballo, cordero, humanos y levaduras
Manosa-resistente K88	F <sub>2</sub>	Enteropatógenos Diarrea de lechones	Plásmido	Glicolípidos Gangliósido GM <sub>1</sub>	Hematíes Pollo y cobayo
K99	F <sub>3</sub>	Diarrea de bóvidos	Plásmido	Gangliósido GM <sub>2</sub>	Caballo y cordero
987P	F <sub>4</sub>	Diarrea de lechones	Plásmido	-	-
CFAI	F <sub>5</sub>	Diarrea humana	Plásmido	Gangliósido GM <sub>2</sub>	Humanos, pollo, bovinos
CFAII E8775	F <sub>6</sub>	Diarrea humana	Plásmido	-	Bovinos, pollo
	-	Diarrea humana Uropatógenos	Plásmido	-	Bovinos
P		Infección urinaria (90%)	Cromosoma	Globotetraosyl cerámido	Humano
Otras fimbrias	F <sub>7</sub> -F <sub>10</sub>	Infección urinaria (10%)	-	-	-

Los plásmidos de resistencia pertenecientes a los distintos grupos de incompatibilidad empezaron a ser estudiados hace varias décadas, se ha observado que todos ellos codifican pili (principalmente conjugativos) que son diferentes en los distintos grupos de incompatibilidad (112). Otras estructuras de superficie con importancia en los procesos de adhesión y en la patogenicidad bacteriana son las cápsulas de polisacáridos que permiten a los microorganismos eludir la acción de diversos mecanismos de defensa del huésped. Se ha postulado que en último extremo la formación de materia capsular podría estar codificada genéticamente en plásmidos transmisibles (102).

El lipopolisacárido (LPS) de *Neisseria meningitidis* se sabe que es el principal determinante de su virulencia (113), y el uso de anticuerpos monoclonales y estudios estructurales han demostrado la heterogenicidad y complejidad del LPS meningocócico el cual se puede dividir en 12 inmunitipos (114). En *Haemophilus influenzae*, una serie de locus implicados en la expresión de la fase variable de epitopos de LPS han sido aislados y elucidado el mecanismo molecular de la expresión de la fase variable (115). De los dos tipos de toxinas que se conocen para *Escherichia coli* enterotóxico en humanos, parece ser que tanto la toxina termolábil como la termorresistente están determinadas por plásmidos, pudiendo los genes para cada una de ellas estar contenidas

en el mismo o diferente plásmido. La localización de los genes para estas toxinas en la cadena plasmídica goza de movilidad no sólo entre células bacterianas, sino también desde una estructura genética a otra dentro de la misma célula (116). Este proceso se ha observado en el sistema flagelar de *Salmonella typhimurium*, donde ocurren transformaciones de cepas virulentas en avirulentas y viceversa.

La forma más habitual de estudiar la regulación genética de los factores de virulencia es la utilización de antibióticos que interfieran en los procesos de traducción y transcripción del DNA, como son: estreptomina, tetraciclina, trimetropim-sulfametoxazol, cloranfenicol y clindamicina (106-117). El crecimiento de las cepas en presencia de estos antibióticos demostró que el efecto antiadhesivo producido depende de la concentración de antibiótico utilizada y que se trata de un efecto de tipo cepa-específico, por cuanto algunas cepas muestran afectación por un antibiótico y no por otro, existiendo por lo demás una correlación detectable entre la susceptibilidad de la cepa y el efecto antiadhesivo de algunos antibióticos; así mismo, se ha demostrado que una dosis subletal de antibióticos puede interferir selectivamente con la síntesis o expresión de ciertos componentes de la superficie bacteriana que pueden estar implicados en la adherencia e hidrofobicidad de microorganismos (117-118).

La observación de Eisenstein y col. (119), de que un mutante de *Escherichia coli* resistente a la estreptomina no era afectado por la misma en su adhesividad, sugiere que dicho efecto es mediado a través de su acción en el ribosoma. Por el contrario, el efecto antiadhesivo de los antibióticos betalactámicos a concentraciones subinhibitorias podría explicarse por las alteraciones que producen en la pared bacteriana (117). Scheld y col. (120), observaron que un tratamiento de 4 horas con vancomicina, penicilina G, tetraciclina, cloranfenicol y estreptomina a  $\frac{1}{4}$  de la C.M.I. influía en la adhesividad de *Streptococcus sanguis* y *Streptococcus faecalis*, no detectándose cambios en la hidrofobicidad de superficie de estos gérmenes por acción de estos antibióticos.

Por todo ello, parece evidente que la adhesión bacteriana a superficies celulares está en función de la expresión del material genético responsable de la síntesis de diversas estructuras de superficie, siendo la hidrofobicidad una propiedad física de importancia en el proceso y de la que nos ocuparemos seguidamente.

#### 5.4.6. Mecanismos de adhesión: importancia de las interacciones hidrofóbicas y su implicación en la interacción célula-célula.

La hidrofobicidad de superficie es un importante factor en la adherencia y por consiguiente en la proliferación de los microorganismos en las superficies sólidas y por tanto, en la adherencia de bacterias a fagocitos, células epiteliales, etc... Por lo general, las bacterias aisladas de tejidos vivos suelen mostrar una hidrofobicidad mayor que las cultivadas de forma prolongada en el laboratorio (58).

Existen una gran variedad de factores físicoquímicos responsables de la unión inicial de la bacteria a las superficies celulares. Las fuerzas de Van der Waals y electrostáticas resultan responsables de una amplia gama de interacciones entre las que cabría destacar: enlaces químicos, interacción dipolar e hidrofobicidad. Las estructuras celulares de superficie pueden alterar la fuerza inicial de adhesión, reduciendo las fuerzas electrostáticas de repulsión o incrementando las fuerzas de atracción (121).

Las superficies celulares, tanto de células procariotas como eucariotas, están cargadas negativamente. Las fuerzas electrostáticas de repulsión entre célula y bacteria pueden ser superadas por fuerzas de atracción de largo y corto alcance, de modo que el enlace específico de fimbrias con receptores de superficie celulares ha de vencer las fuerzas repulsivas existentes entre ambas superficies. Según Smyth y cols. (122), la reducción de potencial celular de superficie por mediación de adhesinas de carácter hidrofóbico probablemente facilite la adhesión, siendo las fuerzas hidrofóbicas un primer paso en la interacción del microorganismo con las superficies mucosas. El alto contenido de aminoácidos apolares en las fimbrias sugiere la existencia en éstas de regiones hidrofóbicas que dotarían de dicho carácter a la superficie bacteriana.

La hidrofobicidad superficial es un factor de adhesión inespecífico que es importante en la proliferación de microorganismos sobre superficies sólidas, y consecuentemente en su adherencia a células epiteliales, fagocitos y otras células (123). Otras propiedades de superficie físicoquímicas, tales como carga, están también implicadas en la unión (124). La hidrofobicidad y superficie bacteriana es importante para la adhesión de la bacteria a substratos insolubles en agua (59). El medioambiente hidrofóbico-hidrofílico de las superficies bacterianas está modulado por sustancias denominadas hidrófobo-afines (aumentan la hidrofobicidad) e hidrofílicas (disminuyen la hidrofobicidad), las cuales pueden coexistir sobre la superficie de la membrana bacteriana externa (125). Son muchos los estudios existentes sobre la contribución de la hidrofobicidad de superficie a la adhesión bacteriana; sobre este aspecto los gérmenes más estudiados son *Salmonella* (123), *Echerichia coli* (126), *N. gonorrhoeae* (127), y *Streptococcus* (128). En el caso del gonococo su superficie celular presenta una membrana externa similar en su composición básica a las otras membranas de gérmenes Gram negativos; sin embargo, esta membrana así como los componentes externos de la misma, tales como pili y material capsular, contribuyen a optimizar su capacidad de adhesión o relación con el huésped.

Las colonias de gonococos T1 y T2, aisladas “in vivo”, son virulentas, en tanto, que las T3 y T4, obtenidas por subcultivos se muestran avirulentas (96), una de las diferencias entre estos tipos de colonias radica en la presencia de pili. Por otra parte, las variantes T2 y T3, denominadas COA positivas, presentan ciertas proteínas de superficie de las que carecen las colonias T1 y T4 (COA negativas). En estos estudios utilizando un sistema de partición de fases con polietilenglicol esterificado con ácido palmítico se demostró que las células pertenecientes a T1 y T2 eran transferidas en una amplia proporción a la fase superior, demostrándose así que a un pH aproximado de 6 los pili poseían un carácter hidrófobo. La presencia del carácter COA negativo no parece afectar al grado de hidrofobicidad de superficie. Es sabido que existen dos factores de gran importancia que se relacionan con la patogenicidad del gonococo: Su capacidad para unirse a superficies mucosas y su capacidad para resistir a la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares. La adhesión a las células epiteliales y también a las células fagocitarias es facilitada por el carácter hidrófobo de los pili, y si bien el primer proceso es una condición inexcusable para que tenga lugar el proceso infeccioso, el segundo de los eventos resulta perjudicial para el normal desarrollo del microorganismo en el huésped.

Los componentes de fimbrias y lipopolisacáridos de superficie de superficie (LPS) intervienen en la adhesión bacteriana, interaccionando no sólo con receptores específicos, sino también con receptores de tipo no específico. Las propiedades

físicoquímicas de estas estructuras de superficie en *Salmonella tiphimurium* y *Serratia marcescens* demuestran que las cepas lisas de *Salmonella tiphimurium* son menos hidrofóbicas que las cepas rugosas. El efecto de los lipopolisacáridos sobre las propiedades hidrofóbicas de las cepas fue evidenciado en varios mutantes rugosos de *Salmonella tiphimurium*, demostrándose un ligero incremento del carácter hidrofóbico siempre que se produce una disminución de la cantidad de antígeno O (LPS) (o de sus componentes oligosacáridos), ya que las moléculas completas de LPS confieren a las bacterias un carácter esencialmente hidrofílico. Otras investigaciones demuestran que una disminución en la proporción de los LPS de superficie en una serie de mutantes de *Salmonella tiphimurium* está relacionada con un incremento de su adhesión a células (123). Las mutaciones de los LPS de superficie en *Salmonella tiphimurium* y *Echerichia coli* parece ser que, por regla general, van acompañadas de una reducción en la cantidad de proteínas y de un aumento relativo en los lípidos de la membrana externa (129).

En los procesos de defensa del organismo, tanto anticuerpos como complemento favorecen la adherencia a los fagocitos; sin embargo, en algunos casos la fagocitosis puede ocurrir en ausencia de anticuerpos y complemento cuando las bacterias son suficientemente hidrofóbicas. Aunque la estructura química de los lipopolisacáridos es bien conocida en varias enterobacterias, poca se conoce de las propiedades físicoquímicas de superficie que influyen en su interacción con las células. Por otra parte, existen proteínas de superficie que contribuyen a la hidrofobicidad al tener un alto contenido en aminoácidos apolares y carecer prácticamente de aminoácidos polares (130), al menos en lo que respecta a la zona externa de las proteínas. De ello se deduce que la presencia de aminoácidos hidrofóbicos en la pared celular puede conferir a la bacteria un carácter hidrófobo, aunque no necesariamente. Ciertos factores como las mutaciones cromosómicas o la transferencia de plásmidos pueden modificar la morfología y composición de la superficie bacteriana y contribuir a incrementar o disminuir su afinidad por moléculas hidrófobas, y como consecuencia, su capacidad adhesiva.

La síntesis de proteínas relacionadas con los pili bacterianos, codificados por los distintos plásmidos de resistencia, podría estar en relación con los cambios observados de las propiedades físicoquímicas de superficie. La asociación de los genes responsables a otros factores del tipo de resistencia a antibióticos dentro del mismo plásmido sería decisiva en la patogenicidad del microorganismo y en los cambios de virulencia del germen (118). Parece indudable que el efecto hidrofóbico ocupa un primer puesto en el proceso de adherencia y determina una forma de acercamiento entre bacteria y célula huésped, contrarrestándose así las fuerzas de repulsión existentes entre las superficies celulares.

#### 5.4.7. *Neisseria meningitidis*. Características del microorganismo.

Fue aislada por primera vez en Viena por el anatomopatólogo Anton Weichselbaum (1845-1920) en 1887 a partir del LCR de pacientes con meningitis y lo denominó *Diplococcus intracellularis meningitidis*. Junto con la *N. gonorrhoeae* o gonococo constituyen las dos únicas patógenas humanas de este género.

Este microorganismo es el productor de la actual meningitis meningocócica, una de las enfermedades que más alarma ha levantado entre la población por su alta mortalidad y morbilidad.

#### Morfología.

*Neisseria meningitidis* pertenece al género *Neisseria*, son cocos gramnegativos, inmóviles, que crecen habitualmente en parejas, aunque a veces lo hacen en tétradas o racimos. Taxonómicamente pertenecen a la familia *Neisseriaceae*, que también incluye los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Kingella*. Tiene un tamaño aproximadamente de 0,8  $\mu\text{m}$  y recién aislados del enfermo poseen Pili. Posen además una cápsula de polisacárido que permite la clasificación en diversos serogrupos denominados A, B, C, D, X, Y, Z, 29E, W135, H, I, K y L.

#### Epidemiología.

Las infecciones por *N. meningitidis* constituyen aún un problema de salud mundial de gran magnitud por su morbimortalidad. Aún haciendo una terapia correcta, la mortalidad se produce en 5 de cada 100 niños menores de 3 años y en 10-15 de cada 100 adultos. Esta mortalidad es variable en función de los distintos serogrupos, siendo las cepas del serogrupo A las que han ocasionado la mayoría de las epidemias importantes. Las cepas de los grupos B y C originan casi siempre enfermedad endémica, aunque a veces son causa de brotes epidémicos. El resto de los serogrupos son con menor frecuencia productores de enfermedad, encontrándose de forma habitual en los cultivos nasofaríngeos.

Esta infección es más frecuente en niños, siendo la causa más importante de meningitis purulenta en el grupo de edad de 6 meses a 5 años, con una incidencia más elevada en el primer año de vida (aunque durante los tres primeros meses hay todavía suficientes anticuerpos maternos como para conferir protección). La vía respiratoria a través de la inhalación de las microgotas suspendidas en el ambiente de individuos infectados constituye la vía de transmisión, requiriéndose un contacto íntimo y un déficit de anticuerpos protectores para el desarrollo de la enfermedad. No obstante, el hábitat natural del meningococo es la mucosa de personas sanas, normalmente asintomáticas, denominadas portadores.

#### Metabolismo.

Su crecimiento se ve favorecido en condiciones aerobias en presencia de un 5-10% de  $\text{CO}_2$  y una humedad relativa del 50%. Sus requerimientos nutritivos son complejos, constituyendo la sangre calentada a 80-90 °C para formar agar chocolate, un medio muy adecuado para su crecimiento. Son incapaces de crecer a  $T^a$  ambiente siendo su  $T^a$  óptima de crecimiento de 36-37 °C. Las cepas se conservan mejor por congelación o liofilización. El hecho de que las colonias se tornen, primero rosadas y después negras, cuando son sometidas a la acción de una solución de dimetilo de tetrametil-p-fenilenendiamina al 1%, le da la condición de oxidasa-positivos.

#### Estructura. Antígenos.



Como todas las bacterias gramnegativas el meningococo posee una pared celular rodeando a la membrana citoplásmica, compuesta por una capa rígida de peptidoglicano y una membrana externa.

La mayoría de los meningococos poseen una cápsula polisacárida que está situada por fuera de la membrana, rodeándola. El ácido N-acetil-neuramínico, componente común de los eucariotas, se ha encontrado en bacterias, observándose sólo en la cápsula meningocócica y en la cápsula químicamente relacionada de *Escherichia coli* K<sub>1</sub>.

La adherencia a las células epiteliales de la mucosa y endoteliales está mediada en el meningococo por los pili o proyecciones filamentosas de naturaleza proteica (pilina). La variabilidad de la secuencia de la pilina radica principalmente en la mitad carboxi-terminal de la molécula, para la que el genoma contiene muchas secuencias incompletas, las cuales, a través de la conversión genética son recombinadas en la copia que será expresada, y si la nueva pilina puede ensamblarse para formar pili, se produce una variante antigénica.

El lipopolisacárido se denomina lipooligosacárido (LOS), por contener cortas cadenas de azúcares (glucosa, galactosa, ácido 3-ceto-2-desoxioctanoico, glucosamina, galactosamina y etanolamina en diferentes proporciones, dependiendo del serotipo). El suero humano en condiciones normales, contiene habitualmente anticuerpos IgM frente al LOS, con capacidad para producir bacteriolisis dependiente del complemento.

La membrana externa del meningococo continuamente está produciendo y liberando al medio, vesículas ricas en endotoxina de gran importancia en la virulencia de esta bacteria. La *N. meningítidis* posee cinco proteínas de membrana externa (OMP). Las OMP de clase 2 y 3 definen el serogrupo de la cepa y la clase 1 el subtipo. Estas tres proteínas son estructurales y actúan como porinas transportando moléculas fuera y dentro de la célula bacteriana.

#### Patogenia.

Los meningococos de los grupos A, B y C son los más patógenos y los que se aislan con más frecuencia a partir de los casos de enfermedad meningocócica teniendo importancia la combinación del serotipo con el serogrupo; Así, el serotipo 2 combinado con el serogrupo B es muy patógeno y se encuentra en el 50% de las meningitis producidas por el grupo B. Los antígenos responsables de la virulencia están asociados con las fimbrias, cápsula y membrana externa. Las fimbrias y algunas proteínas de la membrana externa facilitarían la fijación de las células de la mucosa y la colonización del tracto respiratorio; a la cápsula se le relaciona con la capacidad de invasión por su resistencia a la acción bactericida del suero y propiedades antifagocitarias y finalmente, las vesículas localizadas en la membrana externa que se liberan al medio contienen proteínas y endotoxinas responsables de su acción tóxica.

Entre los cuadros clínicos producidos por la *N. meningítidis* se encuentran:

- Rinofaringitis: es el cuadro más frecuente.

- Sepsis meningocócica: a veces presenta un curso fulminante (Síndrome de Waterhouse-Friederichsen) con colapso vascular por hemorragias masivas y bilaterales de las glándulas suprarrenales.
- Meningitis purulenta.
- Ocasionalmente producen: otitis, artritis, conjuntivitis purulenta y neumonía.

#### Inmunidad.

La mayoría de los adultos tienen anticuerpos protectores frente a la enfermedad meningocócica. Éstos se producen al cabo de una semana de iniciarse el estado de portador meningocócico y están dirigidos no sólo contra los polisacáridos específicos de los grupos capsulares, sino también contra otros antígenos de superficie, incluyendo las proteínas LOS y de membrana externa. Esta inmunidad se consigue tras un contacto anterior con una cepa no encapsulada, con una cepa encapsulada de baja virulencia, con un organismo relacionado no virulento o tras una reacción cruzada al polisacárido de otro origen. El antígeno capsular K92 de *Escherichia coli* reacciona de forma cruzada con el polisacárido del grupo C, y el de *Escherichia coli* K1 es indistinguible del polisacárido del grupo B. Las meningitis meningocócicas de repetición ocurren frecuentemente cuando hay un déficit de los componentes finales del complemento, C5, C7 y C8.

#### Diagnóstico de laboratorio.

Ante una meningitis se obtendrá líquido cefalorraquídeo (LCR) por punción lumbar dividiéndose en dos partes: la 1ª se centrifuga y del sedimento se obtendrá un frotis al que se le aplicará la tinción de Gram, la cual revelará la presencia de abundantes leucocitos polinucleares y escasos diplococos gramnegativos extra o intracelulares.

En el sobrenadante se determinará la albúmina que estará aumentada y la glucorraquia que de forma característica estará baja. Así mismo puede demostrarse la presencia del polisacárido capsular mediante reacciones de inmunodifusión o contraelectroforesis. Con la 2ª muestra se realizarán siembras en placas de agar-sangre y agar-chocolate (agar-sangre calentado) o en medio de Müeller-Hinton, previamente calentado a 37 °C, que se incuban a 36 °C en cámara húmeda con un 10% de CO<sub>2</sub>.

Ante una sepsis se realizará un hemocultivo, pudiéndose aislar también el germen en el aspirado de los elementos petequiales.

Las colonias que crecen en agar sangre son lisas y transparentes, de 1-2 milímetros de diámetro, no hemolíticas, dan la reacción de la catalasa y de las oxidasas adquiriendo un color negro púrpura característico en contacto con una solución de tetrametilparafenilendiamina. La *N. meningitidis* descompone la glucosa y la maltosa por oxidación, no fermenta la lactosa y no reduce los nitratos.

#### Tratamiento.

Los antibióticos de elección son la penicilina y la ampicilina por su excelente actividad intrínseca y su buena penetración en meninges inflamadas. Las sulfamidas y el

cloranfenicol son muy sensibles y penetran bien la barrera hematoencefálica, sin embargo no son de elección, las sulfamidas por su elevado porcentaje de cepas resistentes y el cloranfenicol por su acción tóxica.

**Tabla 5.4.** *N. meningitidis*. Composición del polisacárido capsular.

Serogrupos	Composición
A	Fosfato de N-acetil-3-O-acetilmanosamina ( $\alpha$ 1-6)
B	Ácido N-acetilneuramínico ( $\alpha$ 2-8)
C <sup>+</sup>	Ácido N-acetil-y-O-acetilneuramínico ( $\alpha$ 2-9)
C <sup>-</sup>	Ácido N-acetil-neuramínico ( $\alpha$ 2-9)
D	No se conoce
X	Fosfato de N-acetil-glucosamina ( $\alpha$ 1-4), glucosa ( $\alpha$ 2-6)
Y	Ácido N-acetil-neuramínico, glucosa ( $\alpha$ 2-6)
Z	No se conoce
Z' (29 E)	Ácido 3-deoxi-D-mannooctulosónico
W135	Ácido N-acetil-neuramínico ( $\alpha$ 1-4), galactosa ( $\alpha$ 2-6)

### 5.5. Problemática del portador asintomático de *N. meningitidis*.

El ser humano es el único reservorio natural conocido del meningococo. Entre las hipótesis que se han formulado para explicar la incapacidad del microorganismo para colonizar otro huésped cabe destacar la que atribuye este hecho a que este huésped sería el único a partir del cual el microorganismo podría obtener hierro, fundamental para su crecimiento, debido a la presencia de receptores con afinidad por la transferrina humana. La infección meningocócica se transmite por contagio directo a través de gotas de Plügge y núcleos goticulares de Wells que contengan meningococos procedentes de la nasofaringe de un sujeto infectado, sólo en raras ocasiones *N. meningitidis* se ha aislado en otros epitelios. Dada la fragilidad del microorganismo es necesario un contacto estrecho para que se produzca la transmisión. Esto permite explicar por qué en colectivos cerrados (mayor probabilidad de contacto no portador/portador) se producen aumentos significativos en la prevalencia de portadores.

Aun cuando la existencia de portadores de meningococo se conoce desde finales del siglo pasado, la dinámica del estado de portador y la relación existente entre dicho estado y el desarrollo de enfermedad invasora es poco conocido. Los factores de riesgo individuales que determinan la aparición de enfermedad no se conocen con exactitud, y cabe considerar que la combinación de tres factores, huésped, ambiente y cepa, es la que determina el desarrollo del proceso invasor en unos casos frente al mantenimiento del estado de portador asintomático en otros.

### Huésped

Desde que a finales de la década de los sesenta se demostrara la existencia de una relación inversamente proporcional entre la presencia de anticuerpos bactericidas y la incidencia de enfermedad meningocócica, se acepta que la inmunidad humoral constituye la principal barrera defensiva frente a esta enfermedad (131). El estado de portador es un proceso inmunizante que da lugar a la producción de anticuerpos con

actividad bactericida. La ausencia de este tipo de anticuerpos en individuos de corta edad, derivada de la falta de contacto previo con el meningococo, ayuda a explicar la mayor incidencia de enfermedad meningocócica en niños pequeños.

Además, todas aquellas circunstancias que inmunodepriman al sujeto (malnutrición, alcoholismo, etc.) contribuyen a aumentar la susceptibilidad del huésped a la invasión por *N. meningitidis*. Sin duda otros condicionantes, aun por describir en la actualidad se irán sumando a los ya descritos.

### **Ambiente**

Se considera en este apartado el carácter estacional de la enfermedad meningocócica, tanto en situaciones endémicas como epidémicas, con independencia de la naturaleza de las cepas y las características de la población afectada. Lo que indica la importancia de los factores ambientales en la aparición de la enfermedad. El efecto lesivo que unas condiciones climatológicas desfavorables (frío, baja humedad, etc.) pudieran tener en la mucosa nasofaríngea se ha apuntado como el hecho principal que determina un aumento de incidencia en determinadas épocas del año. A pesar de todo, la influencia de los factores climatológicos sobre la prevalencia de meningococo parece mínima (132).

### **Cepa**

Las características de las cepas que colonizan el sujeto es otro de los factores clave involucrados en el desarrollo de enfermedad meningocócica en unos casos, frente al mantenimiento del estado de portador en otros. La existencia de una serie de complejos clonales responsables de la mayoría de casos de esta enfermedad orienta sobre la importancia de la virulencia de la cepa en el desarrollo de enfermedad invasora. Además en situaciones de epidemia la mayoría de los casos son originados por la misma cepa. La posibilidad reciente documentada de transmisión horizontal ‘interespecie de material genético entre bacterias abre nuevos horizontes para explicar la aparición periódica de cepas hipervirulentas.

En ocasiones, el aumento en el número de casos puede ser debido a la introducción en la población de «nuevas cepas» frente a las que no existe memoria inmunológica; los movimientos migratorios han sido el origen de algunas epidemias así documentadas (132).

La mayoría de estudios de prevalencia de portadores de meningococo se han realizado en instituciones cerradas y generalmente como parte de las investigaciones asociadas a la aparición de un brote epidémico. Los estudios realizados en la población general, no seleccionada, son escasos y los pocos que se han llevado a cabo han encontrado tasas del 5-12%, cifras que distan significativamente de las halladas en colectivos cerrados (20-75%) (133).

Algunos trabajos (134), han relacionado colonización previa por *N. lactámica* con inmunidad permanente hacia *N. meningitidis*, este hecho controvertido ha planteado la posibilidad de utilizar este microorganismo no patógeno como agente inmunizante. Desgraciadamente estas observaciones no han sido documentadas en todos los casos e incluso se han descrito infecciones sistémicas por *N. lactámica* en alguno sujetos (135). Tampoco se ha podido comprobar que de forma constante la exposición previa a *N.*

*meningitidis* en la nasofaringe deje inmunidad permanente hacia ese serotipo, habiéndose descritos casos de infección sistémica por serotipos sobre los que se tenía constancia de colonizaciones previas en alguno huéspedes (135).

Los estudios revisados han relacionado la tasa de portadores según la edad en distintos países europeos con niveles epidemiológicos similares. Los resultados obtenidos establecen una tasa de portador del 4-5 % en la infancia con un pico de prevalencia del 7-23 % a los 19 años y del 7-8% en mayores de 50 años.

La enfermedad meningocócica supone un 25% de las causas de exitus en niños menores de 5 años en Inglaterra en 2007. Se asume que la prevalencia del portador del meningococo en la población es del 10%. Además la prevalencia varía en función de la edad y del entorno. Los índices más altos han sido obtenidos en adolescentes y los distintos estudios han comparado los adolescentes con otros grupos de edad (136). Igualmente los índices más altos han sido encontrados en los contactos familiares de personas que ha sufrido la enfermedad meningocócica y en personal institucionalizado como los militares (137).

La relación entre la enfermedad meningocócica y los portadores no está clara. Olsen y cols. (138) informaron que la tasa de portadores aumenta con el aumento de la enfermedad en las islas Feroe mientras que Fernandez y cols. (139) no encontraron en Galicia un aumento en la tasa de portadores a pesar del aumento de prevalencia de enfermedad meningocócica en 1999. La vacunación frente al meningococo C en Inglaterra obtuvo una protección sobre la enfermedad pero además redujo la tasa de portadores (140).

Hannah Cristensen y cols. (141), realizaron un metaanálisis sobre portadores de meningococo asociado a la edad. De 2582 artículos identificados se seleccionaron 110 artículos relevantes. Las publicaciones elegidas eran de 28 países . 18 estudios eran longitudinales ( 3 en reclutas militares). De los artículos revisados en este metaanálisis, Ronne y cols. (142), señalan una tasa de portador del 20.4 % en personas de edades comprendidas entre los 16 y 20 años en una escuela de Dinamarca en noviembre del 1983 y del 19.8 % en los meses siguientes a marzo. Fraser y cols. (143), indicaban portadores del 25.7 % en una corte de niños de edades comprendidas entre los 15-16 años en una escuela naval en abril del 1972 y del 75.8 % nueve meses más tarde. 89 estudios indicaban datos específicos de portadores por edad y fueron finalmente los elegidos para el metaanálisis. De esos 89 estudios, solamente 48 reflejaban datos de portadores por debajo de los 25 años. Bogaert y cols. (144), señala la tasa de portadores por año de edad entre 1 y 19 años. Caugant y cols. (145), señalan la tasa de portadores por franjas de edad de 5 años ente 0 y 94 años. Las variaciones más sorprendentes eran vistas de los 20 a los 29 años de edad. La tasa de portador según la edad no es lineal (7.7 % a los 10 años de edad, 23,7 % a los 19 años, 13 % 30 años y 7,8% a los 50 años).

De todo lo comentado se evidencia que la edad es el factor que más influye en el estado de portador. Así la prevalencia va aumentando progresivamente hasta un pico en torno a los 19 años, descendiendo después en adultos. La ratio de portadores más altos en adolescentes puede ser atribuido a numerosos factores incluyendo los contactos y comportamientos sociales. (146) En esta franja de edad los contactos son más frecuentes

entre adolescentes ( asistencia a pubs, visitas a clubs y relaciones afectivas) (147). La mayoría de los estudios señalan como portadores a menores de 25 años.

Las poblaciones investigadas en cada estudio pueden mostrar diferencias en lo que a la posición económica se refiere, la proporción de fumadores y en el número de personas que conviven en la misma casa (asociado en muchas ocasiones a la posición económica). Estos factores influyen en el estado de portador. (148-150). Algunos estudios excluían a sujetos si habían tomado antibióticos previamente y otros estudios no los excluían pudiendo suponer este dato un sesgo en la inclusión (151-153).

## **5.6. Meningocemia y meningitis meningocócica (154).**

La meningitis bacteriana es una infección de las meninges por bacterias que viajan allí desde las mucosas a través del torrente sanguíneo.

En los niños y jóvenes > 3 meses las causas más frecuentes de meningitis bacteriana son *N. meningitidis* (meningococo), *Streptococcus pneumoniae* (neumococo) y *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib). Estos organismos se presentan normalmente en el tracto respiratorio superior y pueden causar eventualmente enfermedad invasiva cuando son adquiridos por una persona susceptible.

En los recién nacidos (niños menores de 28 días), los microorganismos causales más comunes son *Streptococcus agalactiae* (estreptococo del grupo B), *Escherichi coli*, *S. pneumoniae* y *Listeria monocytogenes*.

La mayoría de las colonizaciones son asintomáticas, pero a veces el organismo invade el torrente sanguíneo para causar la enfermedad. La enfermedad meningocócica se presenta más comúnmente como meningitis bacteriana (15% de los casos) ó septicemia (25% de los casos), ó como una combinación de los dos síndromes (60% de los casos). La enfermedad meningocócica es la principal causa infecciosa de muerte en la infancia temprana, por lo que su control es una prioridad en salud pública.

La epidemiología de la meningitis bacteriana ha cambiado en las últimas dos décadas que siguieron a la introducción de vacunas para controlar el Hib, el meningococo del serogrupo C y algunos serotipos de neumococos. Como ninguna vacuna está actualmente autorizada contra el meningococo del serogrupo B, este patógeno es la causa más común de meningitis bacteriana (y septicemia) en los niños de más de 3 años.

Algunos niños presentan síntomas y signos inespecíficos y pueden ser difíciles de distinguir de otros cuadros menos importantes (cuadros virales). Reconocer los síntomas de presentación del shock es vital para iniciar tratamiento urgente. Los pediatras debemos reconocer y saber el manejo de la enfermedad meningocócica así como trasladar a los niños con sospecha de meningitis bacteriana ó septicemia meningocócica a la atención especializada desde el ámbito de la atención primaria.

### **5.6.1. Signos de alarma de la enfermedad meningocócica**

Si un niño presenta una erupción petequial y presenta alguno de los siguientes signos durante la evaluación, está en alto riesgo de padecer la enfermedad meningocócica:

- a. Petequias que empiezan a extenderse.
- b. Erupción que se convierte en púrpura.
- c. Hay signos de meningitis bacteriana.
- d. Hay signos de septicemia meningocócica.
- e. El niño presenta mal estado general tras ser valorado por un pediatra.

Ante los signos y síntomas de riesgo arriba descritos se debe administrar previo al transporte la primera dosis de antibiótico vía parenteral pero sin demorar el traslado urgente. Administrar ceftriaxona intravenosa inmediatamente a niños con alta sospecha de enfermedad meningocócica puede resultar vital para el pronóstico final.

Están contraindicados los beta-lactámicos sólo en los niños que tienen una clara historia de anafilaxia después de una dosis previa, si sólo está descrita una erupción cutánea como posible alergia medicamentosa se debe administrar la ceftriaxona vía parenteral.

#### 5.6.2. Diagnóstico de la enfermedad meningocócica

Una vez que el niño queda ingresado en el ámbito hospitalario se debe monitorizar registrando la frecuencia cardíaca, frecuencia respiratoria, saturación de oxígeno, presión arterial, temperatura, perfusión (relleno capilar) y una evaluación neurológica exhaustiva al menos cada hora.

Para el diagnóstico se realizan los siguientes exámenes complementarios:  
1. La punción lumbar es la prueba principal que nos orientará de manera definitiva siendo necesaria para confirmar el diagnóstico de enfermedad meningocócica. En los niños con sospecha de meningitis o sospecha de enfermedad meningocócica hay que realizar una punción lumbar a menos que estén presentes algunas de las siguientes contraindicaciones:

- Signos sugestivos de hipertensión intracraneal.
- Reducción ó fluctuación del nivel de conciencia (Glasgow menos de 9 o una caída de 3 o más).
- Bradicardia e hipertensión.
- Signos neurológicos focales:
  - Pupilas anisocóricas, midriáticas ó con mala respuesta a la luz.
  - Edema de papila visualizado tras la realización de un fondo de ojo.
- Estado postcrítico convulsivo hasta que haya una estabilización.
- Alteraciones de la coagulación.
- Infección local superficial en el sitio de la punción lumbar.
- Insuficiencia respiratoria.

La realización de la punción lumbar no debe demorar la administración de antibióticos por vía parenteral. El examen del LCR debe incluir recuento de glóbulos blancos, proteínas totales y las concentraciones de glucosa, tinción de Gram y cultivo microbiológico. En el LCR el recuento de glóbulos blancos, proteínas totales y las concentraciones de glucosa deben estar disponibles antes de 4 horas para apoyar la decisión respecto a la terapia adyuvante con esteroides. En los recién nacidos  $< 20$  células / microlitro (se consideran valores normales aunque hay que tener en cuenta que recuentos  $< 20$  células / microlitro pueden presentar meningitis bacteriana si presentan otros síntomas y signos sugerentes de meningitis). En niños  $> 1$  mes más de 5 células / microlitro puede considerarse como positivo.

2. El TAC craneal puede ser una herramienta útil para decidir si es seguro realizar una punción lumbar. Si las imágenes cerebrales muestran signos de hipertensión craneal no debe realizarse nunca la punción lumbar. Así mismo en niños con un nivel reducido ó fluctuante del nivel de conciencia (Glasgow  $< 9$  ó una caída de 3 o más en un intervalo corto de tiempo) ó con signos neurológicos focales debe de realizarse siempre primero el TAC craneal y posponer la punción lumbar. Previo al traslado al servicio de RX es prioritario estabilizar clínicamente a los niños.

3. El laboratorio también ayuda a establecer el diagnóstico y a tomar decisiones terapéuticas. Así, si un niño tiene una erupción petequeal inexplicable y fiebre hay que realizar hemograma completo, proteína C reactiva (PCR), estudio de coagulación, bioquímica completa y gasometría. El personal de enfermería aprovechará este momento para la extracción de un hemocultivo. Ante la sospecha no confirmada de enfermedad meningocócica un aumento de los parámetros inflamatorios (leucocitosis, neutrofilia, aumento de PCR) indican la necesidad de tratar empíricamente con ceftriaxona intravenosa hasta la llegada de los restantes exámenes complementarios.

4. La microbiología nos da el diagnóstico de certeza. El aislamiento de la *N. meningitis* en LCR es la prueba que nos evidencia la etiología. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la meningitis bacteriana y la enfermedad meningocócica debe ser realizada tan pronto como sea posible, porque las primeras muestras son más propensas a ser positivas. Hay que tener en cuenta que una PCR negativa en sangre no descarta la enfermedad meningocócica. Enviar LCR al laboratorio para realizar las pruebas de PCR para *N. meningitidis*. Pero sólo realizar la prueba de PCR, si el cultivo de LCR es negativo, teniendo en cuenta que las muestras de LCR tomadas hasta 96 horas después del ingreso en el hospital puede dar resultados útiles.

### 5.6.3. Tratamiento de la enfermedad meningocócica

#### 5.6.3.1. Antibioterapia empírica.

Ante la sospecha de meningitis bacteriana ó enfermedad meningocócica la edad es un factor fundamental para decidir el tratamiento empírico.

En niños  $> 3$  meses de edad con sospecha de meningitis bacteriana tratar sin demora con ceftriaxona intravenosa y a los niños  $< 3$  meses tratar sin demora con cefotaxima intravenosa además de amoxicilina o ampicilina.



En los niños menores de 3 meses, la ceftriaxona se puede utilizar como una alternativa a la cefotaxima (con o sin ampicilina o amoxicilina), pero tener en cuenta que la ceftriaxona no debe ser utilizada en prematuros o en neonatos con ictericia, hipoalbuminemia o acidosis porque puede exacerbar la hiperbilirrubinemia.

#### 5.6.3.2. Administración de fluidos y drogas vasoactivas en la enfermedad meningocócica.

Si hay signos de shock dar un bolo inmediato a 20 ml/ kg de SSF durante 5-10 minutos por vía intravenosa o a través de una vía intraósea y volver a evaluar al niño inmediatamente después. Si los signos de shock persisten dar un segundo bolo de 20 ml / kg de SSF por vía intravenosa o intraósea durante 5-10 minutos. Si los signos de shock aún persisten después de los primeros 40 ml / kg dar otro bolo de la tercera parte de 20 ml / kg por vía intravenosa o intraósea de SSF o solución de albúmina humana 4,5% durante 5-10 minutos. Si persiste situación de shock valorar sedación para intubación urgente traqueal y ventilación mecánica y comenzar el tratamiento con drogas vasoactivas.

Hay que tener en cuenta que algunos niños pueden requerir grandes volúmenes de líquido en un corto período de tiempo para recuperar su volumen circulante. Las drogas vasoactivas utilizadas son la dopamina, dobutamina, adrenalina y noradrenalina. Si el shock persiste a pesar de la reanimación con líquidos (más de 40 ml / kg) y el tratamiento con drogas vasoactivas por vía intravenosa habría que considerar como posibles razones : la acidosis persistente, dilución incorrecta ó la extravasación).

#### 5.6.3.3. La asistencia respiratoria.

Si hay una amenaza de pérdida de permeabilidad de las vías respiratorias, poner en práctica la apertura de la vía aérea y ventilar con presión positiva intermitente con ambú previa a la preparación para la intubación traqueal.

Un pediatra con experiencia en el manejo de vía aérea pediátrica debe realizar la intubación traqueal. Hay que tener en cuenta que los niños con sospecha de meningitis bacteriana confirmada o septicemia meningocócica están muy enfermos y la maniobra de la intubación puede provocar un rápido deterioro.

Las indicaciones de la intubación traqueal serían las siguientes:

a. Aumento del trabajo respiratorio.

b. Hipoventilación o apnea.

c. Insuficiencia respiratoria, incluyendo:

- Respiración irregular (por ejemplo, la respiración de Cheyne-Stokes).
- Hipoxia o disminución de la saturación de oxígeno.
- Hipercapnia.

- d. Shock después de la infusión continua de un total de 40 ml / kg de líquido de reanimación.
- e. Signos de hipertensión intracraneal.
- f. Reducción del nivel o fluctuación de conciencia (Glasgow < 9 o una caída de 3 o más).
- g. Convulsiones intratables.

#### 5.6.3.4. Los corticoides

No utilizar corticosteroides en los niños menores de 3 meses con meningitis bacteriana sospechada. La dexametasona a 0,15 mg / kg hasta una dosis máxima de 10 mg, cuatro veces al día durante 4 días es el corticoide de elección. Si LCR es francamente purulento con sospecha de meningitis bacteriana habría que administrarla tan pronto como sea posible. Igualmente si la punción lumbar revela alguna de las siguientes características: recuento de glóbulos blancos mayor que 1000/microlitro, concentración de proteínas superior a 1 g / litro en LCR ó presencia de bacterias en la tinción de Gram.

Si la dexametasona no se administró con la primera dosis de antibióticos hay que pautar la primera dosis dentro de las 4 horas siguientes a la primera dosis de antibióticos pero no pautar dexametasona si han transcurrido más de doce horas.

No tratar con corticoides a dosis altas (definida como la dexametasona 0,6 mg / kg / día o una dosis equivalente de otros corticosteroides. En los niños con shock que no responde a otros agentes vasoactivos, la terapia de reemplazo de esteroides dosis bajas de corticosteroides (hidrocortisona 25 mg/m<sup>2</sup> cuatro veces al día) debe ser utilizado sólo cuando se dirige por un intensivista pediátrico.

#### 5.6.3.5. Terapias complementarias.

No hay evidencia en la utilización de proteína C activada recombinante en los niños y jóvenes con septicemia meningocócica.

#### 5.6.4. Quimioprofilaxis y vacunas en la enfermedad meningocócica.

Diversos estudios europeos han comprobado que la proporción de casos secundarios en convivientes cercanos a un caso índice de enfermedad meningocócica invasiva oscila entre el 3-16%. Los estudios observacionales han demostrado que la quimioprofilaxis de convivientes puede erradicar *N. meningitidis* de la nasofaringe y reducir los casos de enfermedad meningocócica invasiva entre convivientes. Existen menos datos sobre los índices de transmisión asintomática de *N. meningitidis* entre convivientes de un caso índice.

W. Hellenbrand y cols. (155) recogen las evidencias existentes sobre la utilidad de la quimioprofilaxis frente a *N. meningitidis*. La quimioprofilaxis antibiótica se ha mostrado eficaz en el control del riesgo de infección sistémica tras contacto con un caso de enfermedad diseminada, riesgo que va a depender de las características de la cepa,

del ambiente y del huésped. El antibiótico habitualmente utilizado en quimioprofilaxis frente a *N. meningitidis* es la rifampicina a dosis de 10 mg/Kg, dos dosis al día durante 2 días; sin embargo en gestantes o pacientes con enfermedad hepática la ceftriaxona puede ser de elección, dosis IM única de 250 mg o 125 mg en menores de 2 años. El ciprofloxacino es también recomendado por algunos autores, aunque sus indicaciones en pediatría son limitadas. Tras profilaxis la recolonización por *N. meningitidis* puede ocurrir. La penicilina, ciprofloxacino, rifampicina y minociclina son efectivos para erradicar *N. meningitidis* de nasofaringe hasta 1 semana después de recibir profilaxis; sin embargo, tras un periodo de 1-2 semanas, solo rifampicina y ciprofloxacino se mostraron efectivos para erradicar *N. meningitidis* de nasofaringe. Tras 4 semanas sólo la rifampicina se mostró eficaz. Ningún estudio comparó ceftriaxona con placebo; sin embargo en las comparaciones entre rifampicina y ceftriaxona o ceftriaxona y ciprofloxacino, la ceftriaxona se mostró mas efectiva tras 1-2 semanas para erradicar *N. meningitidis* de la nasofaringe.

J. L. Woodard y cols (156), revisa la prevención de la enfermedad meningocócica con las vacunas disponibles en la actualidad. La primera vacuna disponible frente a meningococo consistió en una vacuna tetravalente frente a los polisacáridos de la cápsula A, C, Y W135. El serogrupo B no se incluyó en la vacuna por ser poco inmunógeno. Entre las limitaciones de esta vacuna se citan la ausencia de respuestas duraderas, la ausencia de respuesta inmunitaria dependiente de células T y la ausencia de inmunogenicidad en niños de menos de 2 años de edad. En niños de menos de 5 años de edad, los anticuerpos frente a los grupos A y C disminuyen sustancialmente a los 3 años después de la vacunación. Además, múltiples dosis de una vacuna con polisacáridos capsulares puede originar una hiporrespuesta.

En la actualidad esta disponible además, la vacuna del serogrupo C de *N. meningitidis* conjugada con un transportador proteico que contiene varios epitopos de células T. La introducción de la vacunación sistemática en la población ha originado una disminución del 66% de los portadores faríngeos asintomáticos de meningococo C. Desde 2005 esta disponible en USA la vacuna conjugada tetravalente (Menactra®), que incorpora los 4 serogrupos clásicos de la vacuna frente a polisacáridos de la cápsula: A, C, Y, W135.

Las tres recomendaciones actuales para vacunación con Menactra incluyen:

- Vacunación de rutina en preadolescentes (11-12 años).
- Antes de la entrada en la Universidad si no estaba previamente vacunado.
- Otras colectividades en el rango de edad de 11 a 55 años.



## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**



## JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

---

Tradicionalmente, el interés hacia los portadores asintomáticos de *Neisseria meningitidis*, deriva de la posibilidad de que el huésped pueda albergar y ser vehículo de transmisión de cepas potencialmente patógenas. Aunque fundamentalmente es la genética de la bacteria la responsable en gran medida de los cambios de virulencia, otros factores relacionados con el huésped pueden estar implicados. La cada vez más frecuente utilización de forma indiscriminada de tratamientos antibióticos favorece el recambio periódico de la flora comensal de la nasofaringe y facilita la colonización por nuevas bacterias, con el recambio genético consiguiente. El contacto mantenido entre *N. meningitidis* y huésped conlleva, en situaciones de normalidad, a la sensibilización y producción de anticuerpos neutralizantes frente al microorganismo, con posterior erradicación de la bacteria de la nasofaringe. Por otro lado, se ha comprobado que en la enfermedad meningocócica existe un estrés oxidativo muy incrementado (157) y que en estas situaciones los mecanismos de control inmunológico son ineficaces, a lo que se une la facultad de *N. meningitidis* de tolerar situaciones de estrés oxidativo que otros microorganismos no tolerarían.

Que la prevalencia del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* varía considerablemente con la edad del huésped es un hecho ampliamente conocido y sobre el que se han encontrado explicaciones parciales; en todo este proceso, la influencia del estado inmunológico parece decisiva. Sin embargo, el incremento de la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* desde el inicio de la pubertad hasta la adolescencia, período de la vida donde el sistema inmunológico está plenamente desarrollado, continúa en la actualidad mal documentado.

El estado de portador de *N. meningitidis* presenta modificaciones en su prevalencia durante la infancia descritas por diversos autores, con una frecuencia bimodal, y puntas de máxima incidencia en torno a los 3 primeros años de vida y al final de la primera década de la vida e inicio de la segunda. Períodos que coinciden con los períodos de crecimiento acelerado según el modelo matemático de Karlberg (2), períodos donde la generación de radicales libres estaría también aumentada. Dado que algunos autores (158-159), han relacionado el estrés oxidativo con situaciones de hiporrespuesta inmunológica; esta situación de “hipotonía inmunológica” ha servido a I. Goldschneider y cols. (131), para explicar tanto el incremento de la prevalencia de enfermedad meningocócica como la persistencia de *N. meningitidis* en la nasofaringe de portadores asintomáticos.

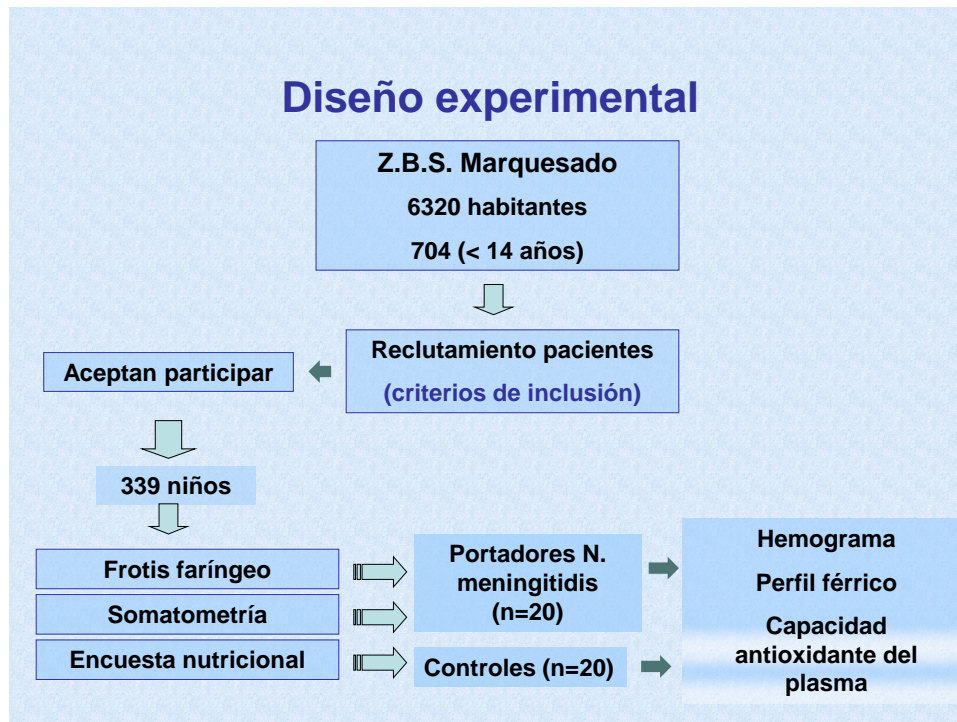
El crecimiento junto con el aumento de la adiposidad suponen un incremento en la producción de radicales libres y del consumo de los recursos antioxidantes del organismo, expresión en algunos casos, del estado nutricional de base del individuo. Por ello, planteamos la hipótesis de que la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* podría relacionarse con el balance REDOX del medio interno e hipofunciones transitorias del estado inmunológico secundarias a las alteraciones del equilibrio de oxidoreducción. Por otro lado, se hace preciso conocer cual es la situación de partida en lo que al estado de portador asintomático de *N. meningitidis* se refiere en nuestra provincia. El presente trabajo de Tesis doctoral plantea el estudio en un medio rural, eligiéndose una Zona Básica asequible y suficientemente alejada de núcleos urbanos.

Argumentos, que en definitiva, constituyen la base para el planteamiento de los objetivos que al inicio de este proyecto nos planteamos y que se podrían resumir bajo los siguientes términos:

- Analizar en un grupo poblacional abierto y rural la prevalencia de portadores asintomáticos de *N. meningitidis*.
- Valorar la relación entre incremento del índice masa corporal, especialmente en situaciones de sobrepeso y obesidad sobre el estado de portador asintomático de *N. meningitidis*.
- Analizar los niveles de antioxidantes plasmáticos en una muestra amplia de esa población y estudiar la existencia de asociaciones con parámetros somatométricos, bioquímicos y nutricionales.
- Finalmente, mediante la utilización de diversas técnicas estadísticas, buscar relaciones entre persistencia de estado de portador asintomático de *N. meningitidis* y balance de actividad antioxidante en plasma.



En el desarrollo de nuestro estudio hemos seguido el planteamiento que esquemáticamente se describe en la figura siguiente:



**Figura 6.1.** Diseño experimental del proyecto de Tesis doctoral.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## MATERIAL Y MÉTODO

---

### 7.1. Definición de la muestra.

La Zona Básica de Salud de Marquesado (Granada), es una comarca rural de 6320 habitantes, que agrupa 8 municipios con una población infantil estimada de 704 niños con edades comprendidas entre 1 y 14 años. Los sujetos participantes se reclutaron tras solicitud expresa del padre o tutor. Para ello, se anunció en los Tablones de los Consultorios médicos de las localidades dependientes de la ZBS de Marquesado el inicio del estudio, su fundamento, finalidad y como debían los usuarios solicitar la cita.

### 7.2. Selección de la muestra y criterios de inclusión.

Como único requisito para su inclusión en el estudio, el sujeto debe estar asintomático y no debe haber tomado tratamiento antibiótico en las últimas 2 semanas. En el momento de su inclusión se recogen los datos de filiación, antecedente de consumo de antibióticos en los últimos 2 meses, parámetros antropométricos y frotis faríngeo. En función del resultado del cultivo de exudado faríngeo se realiza un estudio caso control anidado, considerándose como caso los niños portadores de *N. meningitidis* y como controles los pacientes de la misma edad y sexo no portadores de *N. meningitidis* reclutados en orden siguiente al caso previo. Son excluidos del estudio aquellos pacientes que explícitamente lo solicitan.

El estudio se inició en Enero de 2003 y se dio por finalizado en Marzo de 2004. La relación de pacientes reclutados, su localidad de procedencia y fecha de nacimiento se reproducen en la Tabla 7.1. a 7.8.

**Tabla 7.1.** Relación de pacientes incluidos en el estudio.

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
1	E.R.M.	30.11.1992	ALQUIFE	Niña
2	A.N.L.	19.01.1994	LANTEIRA	Niño
3	F.S.C.	14.01.1998	DÓLAR	Niña
4	J.I.N.L.	04.08.2001	LANTEIRA	Niño
5	M.H.V.	18.09.2002	CHARCHES	Niña
6	A.S.C.	26.04.2001	DÓLAR	Niño
7	R.L.L.	20.01.1999	HUENEJA	Niño
8	V.C.S.	15.09.2000	LA CALAHORRA	Niña
9	J.R.M.	16.08.2002	LA CALAHORRA	Niño
10	E.J.G.	09.09.1995	HUENEJA	Niña
11	M.J.G.	04.01.1998	HUENEJA	Niña
12	A.M.S.	12.03.2000	DÓLAR	Niño
13	A.M.S.	30.04.1993	DÓLAR	Niño
14	E.G.V.	30.08.1992	CHARCHES	Niña
15	Y.V.H.	26.06.1993	LANTEIRA	Niña
16	J.R.M.	24.04.1994	ALQUIFE	Niño
17	M.G.V.	05.06.1997	CHARCHES	Niño
18	M.R.M.	29.07.1997	ALQUIFE	Niña
19	A.E.V.	06.11.2000	CHARCHES	Niña
20	L.R.H.	03.11.2001	LANTEIRA	Niña
21	Y.V.G.	29.09.2002	CHARCHES	Niña
22	M.E.R.E.	12.09.1990	HUENEJA	Niña
23	J.H.A.	06.06.1994	ALDEIRE	Niña
24	R.R.E.	25.08.1995	HUENEJA	Niño
25	A.A.E.	31.01.2000	DÓLAR	Niña
26	T.H.A.	14.04.2000	ALDEIRE	Niña
27	P.R.N.	10.01.2002	LANTEIRA	Niña
28	J.A.R.E.	25.09.1997	HUENEJA	Niño
29	M.N.C.	18.12.1994	ALQUIFE	Niña
30	E.N.C.	16.09.1996	ALQUIFE	Niña
31	J.M.V.R.	11.08.1997	ALQUIFE	Niño
32	P.F.M.	30.09.2001	ALDEIRE	Niño
33	J.M.O.	12.12.1992	LANTEIRA	Niño
34	I.L.L.	08.05.1996	ALDEIRE	Niño
35	J.D.E.M.	21.03.1997	ALDEIRE	Niño
36	F.S.T.	05.01.1998	JEREZ	Niño
37	J.A.T.R.	21.03.1998	JEREZ	Niño
38	E.T.G.	29.11.2001	JEREZ	Niño
39	J.T.R.	04.06.2002	JEREZ	Niño
40	T.S.T.	17.03.1991	JEREZ	Niña
41	S.V.R.	20.04.1991	ALQUIFE	Niño
42	L.I.R.	02.12.1996	ALQUIFE	Niña
43	A.C.R.	22.01.1999	HUENEJA	Niño
44	I.T.B.	23.05.2001	JEREZ	Niño

**Tabla 7.2.** Relación de pacientes incluidos en el estudio (Cont.).

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
45	F.S.G.	06.12.1999	ALQUIFE	Niño
46	D.O.G.	30.01.1997	CHARCHES	Niño
47	A.G.R.	30.08.1998	JEREZ	Niña
48	C.E.H.	03.12.1998	CHARCHES	Niño
49	J.I.N.A.	17.05.2000	ALQUIFE	Niño
50	F.E.H.	19.05.2002	CHARCHES	Niña
51	I.O.G.	28.05.2002	CHARCHES	Niña
52	J.M.A.G.	13.10.2002	JEREZ	Niño
53	J.L.G.O.	09.06.1991	LANTEIRA	Niño
54	M.G.R.	20.09.1991	JEREZ	Niña
55	S.C.R.	22.03.1993	HUENEJA	Niña
56	A.N.A.	05.01.1994	ALQUIFE	Niña
57	A.P.P.	10.11.1989	DÓLAR	Niña
58	S.P.P.	17.03.1995	DÓLAR	Niña
59	A.E.G.	17.01.1998	JEREZ	Niña
60	F.M.C.	26.07.1998	DÓLAR	Niño
61	A.N.T.	26.02.2001	DÓLAR	Niño
62	N.N.M.	02.10.2001	JEREZ	Niña
63	N.M.G.	22.12.2001	HUENEJA	Niña
64	A.S.S.	18.11.2001	DÓLAR	Niño
65	P.S.C.	22.08.1994	ALQUIFE	Niña
66	R.C.V.	23.05.1997	ALQUIFE	Niña
67	F.A.T.M.	18.10.1997	JEREZ	Niño
68	R.G.R.	30.11.1997	HUENEJA	Niño
69	M.F.R.M.	10.02.1999	JEREZ	Niño
70	A.O.M.	16.06.2000	JEREZ	Niño
71	C.M.P.	08.11.2000	ALDEIRE	Niña
72	A.T.C.	28.08.2001	ALQUIFE	Niño
73	L.M.C.S.	27.01.1994	ALQUIFE	Niño
74	H.L.C.	05.12.1994	CHARCHES	Niño
75	J.J.L.C.	29.06.1999	CHARCHES	Niño
76	C.D.R.	29.08.1990	CHARCHES	Niña
77	L.G.B.	09.04.1992	LANTEIRA	Niña
78	V.G.F.	23.08.1992	ALQUIFE	Niño
79	S.B.G.	15.02.1993	LANTEIRA	Niña
80	J.A.T.G.	20.09.1995	FERREIRA	Niño
81	J.M.S.P.	11.10.1995	ALQUIFE	Niño
82	J.A.B.G.	02.08.1999	LANTEIRA	Niño
83	S.S.P.	07.01.2001	ALQUIFE	Niño
84	R.C.V.	13.01.1990	ALQUIFE	Niña
85	J.A.B.C.	23.05.1991	ALQUIFE	Niño
86	A.M.P.	12.12.1991	ALQUIFE	Niño
87	E.V.S. Z	02.12.1995	ALQUIFE	Niño
88	J.A.C.C.	26.12.1996	ALQUIFE	Niño

**Tabla 7.3.** Relación de pacientes incluidos en el estudio (Cont.).

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
89	F.B.C.	17.05.1999	ALQUIFE	Niña
90	G.V.S.	27.12.1999	ALQUIFE	Niño
91	L.M.M.	16.10.2001	DÓLAR	Niño
92	M.L.L.	30.03.1990	ALDEIRE	Niño
93	M.C.C.	29.09.1993	ALQUIFE	Niña
94	V.H.T.	19.07.1994	LANTEIRA	Niña
95	R.P.R.	05.02.1995	ALQUIFE	Niño
96	S.G.R.	02.09.1997	LANTEIRA	Niño
97	A.R.T.	04.10.1998	LANTEIRA	Niña
98	J.P.A.	02.11.2000	ALQUIFE	Niño
99	J.R.T.	14.08.1991	LANTEIRA	Niño
100	A.P.G.	09.11.1992	ALQUIFE	Niño
101	P.V.D.	16.05.2001	ALQUIFE	Niña
102	A.G.A.	31.08.1991	HUENEJA	Niño
103	J.E.G.A.	12.03.1995	HUENEJA	Niño
104	A.G.A.	09.03.1998	HUENEJA	Niño
105	P.D.L.	07.03.1999	ALDEIRE	Niño
106	E.B.L.	27.09.2001	JEREZ	Niña
107	J.A.B.L.	01.11.1991	JEREZ	Niño
108	F.S.I.	02.02.1996	HUENEJA	Niño
109	E.S.I.	01.07.1994	HUENEJA	Niña
110	J.A.D.L.	15.07.1995	ALDEIRE	Niño
111	A.G.M.	29.01.1990	ALQUIFE	Niño
112	L.M.H.	17.07.1991	ALQUIFE	Niña
113	M.C.A.	08.01.1993	ALQUIFE	Niño
114	Y.M.H.	03.03.2001	ALQUIFE	Niña
115	N.C.A.	01.10.2002	ALQUIFE	Niño
116	M.B.N.S.	16.03.1996	LANTEIRA	Niña
117	C.C.A.	03.05.2002	ALQUIFE	Niña
118	M.P.E.M.	28.02.1999	ALQUIFE	Niña
119	P.S.R.	01.05.1990	ALQUIFE	Niño
120	A.L.S.R.	27.04.1993	ALQUIFE	Niña
121	A.A.R.	16.07.1993	ALQUIFE	Niño
122	M.M.R.	02.06.1995	ALDEIRE	Niño
123	L.J.H.	09.08.1996	HUENEJA	Niña
124	S.C.C.	19.05.1999	HUENEJA	Niña
125	MC.M.	22.05.2001	ALDEIRE	Niña
126	J.C.C.	31.10.2002	HUENEJA	Niño
127	C.L.R.	27.11.1995	LANTEIRA	Niña
128	M.R.A.S.	22.12.1996	HUENEJA	Niña
129	F.A.S.	09.09.1999	HUENEJA	Niño
130	Y.G.R.	29.06.1991	LANTEIRA	Niña
131	C.M.C.	14.07.1992	ALQUIFE	Niña
132	V.S.M.	04.02.1993	ALQUIFE	Niña



**Tabla 7.4.** Relación de pacientes incluidos en el estudio (Cont.).

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
133	J.B.B.	11.12.1994	LANTEIRA	Niño
134	N.H.G.	22.08.2002	LANTEIRA	Niña
135	A.H.G.	21.03.1992	LANTEIRA	Niño
136	M.R.G.	19.06.1990	ALQUIFE	Niño
137	M.H.G.	13.06.1997	LANTEIRA	Niño
138	J.R.G.	12.05.1998	ALQUIFE	Niño
139	M.H.L.	13.11.2002	CHARCHES	Niña
140	R.M.S.	08.12.1998	HUENEJA	Niño
141	M.L.M.S.	14.08.2002	HUENEJA	Niña
142	A.O.E.	27.07.1997	JEREZ	Niño
143	J.M.H.D.	02.09.1999	LANTEIRA	Niño
144	E.G.G.	02.01.2000	HUENEJA	Niño
145	R.R.H.	30.12.2000	LANTEIRA	Niña
146	<b>A.G.G.</b>	11.01.2001	HUENEJA	Niño
147	P.O.E.	14.05.2001	JEREZ	Niño
148	M.I.J.D.	14.07.1992	LANTEIRA	Niña
149	M.P.R.H.	24.09.1993	LANTEIRA	Niña
150	J.I.N.C.	15.09.1991	LANTEIRA	Niño
151	I.A.D.	11.06.1999	ALQUIFE	Niño
152	J.A.D.	15.08.2000	ALQUIFE	Niño
153	F.G.M.	21.11.1990	ALQUIFE	Niño
154	T.G.M.	21.11.1990	ALQUIFE	Niño
155	J.M.V.A.	25.06.1992	LANTEIRA	Niño
156	S.B.R.	24.05.1994	JEREZ	Niño
157	M.G.P.	14.03.1995	CHARCHES	Niño
158	I.G.M.	25.09.1995	ALQUIFE	Niño
159	R.B.R.	01.05.1999	JEREZ	Niño
160	A.G.P.	13.06.1999	CHARCHES	Niña
161	A.O.T.	27.02.1999	LANTEIRA	Niña
162	V.M.M.R.	14.08.1989	LANTEIRA	Niño
163	S.C.C.	07.12.1992	HUENEJA	Niña
164	F.D.A.	22.05.1999	HUENEJA	Niño
165	M.M.R.	28.03.2002	LANTEIRA	Niño
166	J.M.R.C.	04.07.1990	LA CALAHORRA	Niño
167	J.M.G.G.	21.08.1991	JEREZ	Niño
168	I.O.M.	13.03.1993	JEREZ	Niño
169	D.R.C.	21.07.1994	LA CALAHORRA	Niño
170	J.L.P.G.	30.10.1995	ALDEIRE	Niño
171	A.G.G.	24.06.1996	JEREZ	Niño
172	E.S.G.	18.08.1999	JEREZ	Niña
173	Y.P.T.	25.09.1999	ALDEIRE	Niña
174	C.P.G.	11.02.2000	ALDEIRE	Niño
175	P.S.	20.08.2002	DÓLAR	Niño
176	M.P.T.	26.05.1992	ALDEIRE	Niña

**Tabla 7.5.** Relación de pacientes incluidos en el estudio (Cont.).

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
177	B.H.T.	02.06.1992	LA CALAHORRA	Niña
178	I.P.R.	13.02.1992	HUENEJA	Niño
179	M.A.P.R.	02.01.2001	HUENEJA	Niño
180	J.A.G.C.	01.02.1993	LANTEIRA	Niño
181	P.M.S.	14.11.1994	LANTEIRA	Niño
182	S.M.A.	18.04.1995	ALQUIFE	Niña
183	A.N.G.	08.04.1995	LANTEIRA	Niña
184	V.B.M.	19.03.1999	ALDEIRE	Niño
185	M.J.M.R.	14.03.1999	LANTEIRA	Niña
186	I.N.G.	29.05.1991	LANTEIRA	Niña
187	F.M.M.R.	25.01.1992	LANTEIRA	Niño
188	J.C.S.	21.02.1992	LANTEIRA	Niño
189	E.C.S.	16.03.1993	LANTEIRA	Niño
190	A.R.I.	24.09.1992	DÓLAR	Niño
191	M.M.R.	01.12.1993	ALQUIFE	Niña
192	M.L.L.G.	12.01.1994	ALQUIFE	Niña
193	J.L.P.G.	07.06.1995	ALQUIFE	Niño
194	D.M.M.	18.11.1995	ALQUIFE	Niño
195	E.G.G.	20.01.1996	JEREZ	Niño
196	A.M.R.	22.05.1997	ALQUIFE	Niña
197	M.R.I.	30.10.1998	DÓLAR	Niña
198	E.G.V.	12.11.1998	JEREZ	Niña
199	F.M.M.	03.06.1993	ALQUIFE	Niño
200	P.G.G.	08.06.2001	JEREZ	Niña
201	P.S.S.	19.08.1990	JEREZ	Niño
202	A.H.P.	07.04.1998	ALQUIFE	Niño
203	M.I.M.M.	13.02.1994	LA CALAHORRA	Niña
204	B.R.C.	13.05.1997	HUENEJA	Niña
205	M.J.E.	27.06.1997	HUENEJA	Niño
206	J.M.N.R.	29.08.1998	LANTEIRA	Niño
207	M.C.N.R.	08.08.1999	LANTEIRA	Niña
208	C.J.E.	30.03.2000	HUENEJA	Niña
209	R.A.E.	02.07.2001	ALQUIFE	Niño
210	J.G.G.	11.08.1990	HUENEJA	Niño
211	C.C.P.	26.05.1994	ALQUIFE	Niño
212	A.R.C.	24.06.1992	HUENEJA	Niña
213	M.A.E.	22.09.1999	ALQUIFE	Niña
214	A.D.Z.	28.04.1992	LANTEIRA	Niño
215	A.T.V.	20.01.1989	JEREZ	Niño
216	J.C.C.V.	05.06.1989	LANTEIRA	Niño
217	E.T.V.	31.10.1990	JEREZ	Niña
218	A.S.S.	19.03.1995	JEREZ	Niña
219	R.H.R.	06.03.2001	JEREZ	Niño

**Tabla 7.6.** Relación de pacientes incluidos en el estudio (Cont.).

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
220	R.S.O.	26.11.1996	JEREZ	Niño
221	C.H.P.	02.12.1991	ALQUIFE	Niño
222	A.C.V.	30.12.1994	LANTEIRA	Niña
223	J.R.R.	05.05.1990	LANTEIRA	Niño
224	R.A.F.	11.08.1990	LA CALAHORRA	Niño
225	C.R.R.	24.05.1996	LANTEIRA	Niña
226	A.A.F.	16.11.1996	LA CALAHORRA	Niña
227	E.R.C.	21.02.1998	ALDEIRE	Niña
228	A.Z.O.	17.09.1999	JEREZ	Niña
229	A.C.M.	14.05.2001	HUENEJA	Niño
230	M.L.A.	06.06.1998	HUENEJA	Niña
231	L.M.R.	20.05.2001	HUENEJA	Niña
232	A.L.A.	21.09.2002	HUENEJA	Niña
233	N.B.C.	09.12.2002	FERREIRA	Niña
234	P.B.Z.	27.11.2002	JEREZ	Niña
235	T.P.G.	12.05.1990	HUENEJA	Niña
236	L.C.R.	07.05.1995	ALDEIRE	Niña
237	A.B.C.	13.05.1996	FERREIRA	Niño
238	J.M.P.G.	30.07.1998	HUENEJA	Niño
239	V.M.G.M.	16.01.1995	LA CALAHORRA	Niño
240	M.G.M.	21.10.1999	LA CALAHORRA	Niña
241	A.C.G.	16.01.2002	JEREZ	Niña
242	C.P.M.	17.04.2002	LA CALAHORRA	Niño
243	J.L.R.G.	18.09.2002	LA CALAHORRA	Niño
244	A.G.G.	11.03.2002	LA CALAHORRA	Niña
245	D.R.G.	16.03.1993	LA CALAHORRA	Niña
246	F.F.O.	09.11.1992	JEREZ	Niño
247	A.M.H.	22.03.1997	ALDEIRE	Niña
248	C.G.P.	29.07.1995	LANTEIRA	Niña
249	M.C.G.P.	17.01.2000	LANTEIRA	Niña
250	S.U.G.	19.04.2000	LANTEIRA	Niño
251	A.H.P.	16.04.1991	ALDEIRE	Niña
252	P.M.G.	18.10.2000	JEREZ	Niño
253	O.P.G.	27.12.1993	DÓLAR	Niña
254	J.C.F.	20.06.2002	JEREZ	Niño
255	A.V.Z.	18.11.1994	JEREZ	Niño
256	J.L.V.G.	06.08.1995	LA CALAHORRA	Niño
257	C.V.Z.	01.11.1999	JEREZ	Niña
258	M.M.F.	24.06.2002	JEREZ	Niño
259	D.V.G.	13.05.1992	LA CALAHORRA	Niño
260	E.C.D.	23.08.1992	ALQUIFE	Niña
261	G.C.C.	25.11.1995	LA CALAHORRA	Niño
262	C.M.T.	01.02.1993	JEREZ	Niño

**Tabla 7.5.** Relación de pacientes incluidos en el estudio (Cont.).

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
263	L.C.R.	22.07.1993	HUENEJA	Niña
264	R.E.M.	18.06.1994	LA CALAHORRA	Niño
265	J.R.G.	06.05.1995	HUENEJA	Niño
266	A.E.M.	16.03.1998	LA CALAHORRA	Niño
267	A.C.R.	16.05.2000	HUENEJA	Niño
268	A.S.V.	07.03.1993	ALQUIFE	Niño
269	B.S.H.	12.07.1992	JEREZ	Niña
270	R.E.T.	09.11.1993	JEREZ	Niño
271	T.S.H.	15.05.1995	JEREZ	Niño
272	J.E.T.	02.01.1996	JEREZ	Niño
273	J.A.N.S.	29.09.1996	JEREZ	Niño
274	T.T.B.	09.08.1997	JEREZ	Niño
275	E.M.M.	27.05.1998	LA CALAHORRA	Niña
276	S.Y.T.	26.10.1999	HUENEJA	Niño
277	E.M.R.	01.10.2000	LA CALAHORRA	Niña
278	J.A.M.M.	11.08.2002	LA CALAHORRA	Niño
279	M.Y.T.	28.11.2002	HUENEJA	Niña
280	M.Y.T	28.11.2002	HUENEJA	Niña
281	O.C.H.	23.11.2001	LA CALAHORRA	Niña
282	L.C.L.	25.09.2002	JEREZ	Niña
283	C.C.C.	20.09.1994	LA CALAHORRA	Niña
284	S.R.G.	19.04.1996	HUENEJA	Niño
285	A.R.P.	07.08.1998	HUENEJA	Niño
286	J.F.M.	04.08.1999	DÓLAR	Niño
287	J.M.R.G.	19.04.2000	HUENEJA	Niño
288	A.V.F.	29.12.2001	HUENEJA	Niño
289	A.M.P.	01.08.1992	HUENEJA	Niña
290	L.V.F.	14.07.2000	HUENEJA	Niña
291	R.O.S.	03.03.1993	LA CALAHORRA	Niña
292	J.R.P.	02.06.1995	HUENEJA	Niño
293	V.M.O.S.	27.08.1995	LA CALAHORRA	Niño
294	J.F.R.	14.04.1990	JEREZ	Niño
295	M.M.S.	10.02.1993	JEREZ	Niña
296	S.E.L.	08.09.1995	JEREZ	Niña
297	R.V.C.	03.04.1996	JEREZ	Niña
298	M.M.U.	02.02.1997	JEREZ	Niña
299	B.V.C.	28.11.1999	JEREZ	Niña
300	A.S.J.	13.01.2003	JEREZ	Niña
301	R.S.G.	12.10.1991	LA CALAHORRA	Niño
302	B.L.E.	22.09.1993	JEREZ	Niño
303	L.S.G.	19.11.1994	LA CALAHORRA	Niña
304	M.A.C.C.	27.10.1998	LA CALAHORRA	Niño
305	J.C.G.	20.12.1991	HUENEJA	Niño

**Tabla 7.8.** Relación de pacientes incluidos en el estudio (Cont.).

<b>Id</b>	<b>Iniciales</b>	<b>Fecha nacimiento</b>	<b>Municipio</b>	<b>Sexo</b>
306	B.M.P.	27.04.1998	HUENEJA	Niño
307	C.F.A.	24.05.1992	LA CALAHORRA	Niña
308	R.S.A.	28.05.1992	LA CALAHORRA	Niño
309	N.R.S.	17.02.1993	HUENEJA	Niña
310	S.G.G.	10.05.1994	LA CALAHORRA	Niña
311	M.C.O.H.	17.07.1995	ALDEIRE	Niña
312	S.R.S.	02.12.1996	HUENEJA	Niño
313	A.G.G.	29.08.1997	LA CALAHORRA	Niña
314	N.F.A.	30.10.1998	LA CALAHORRA	Niña
315	C.H.F.	30.05.1992	DÓLAR	Niño
316	J.A.A.P.	16.07.1993	ALQUIFE	Niño
317	L.A.P.	09.11.1995	ALQUIFE	Niña
318	P.M.O.	22.02.2000	JEREZ	Niña
319	A.L.G.	14.06.1993	JEREZ	Niño
320	N.J.S.	15.07.1990	LA CALAHORRA	Niña
321	A.M.C.	02.05.2000	LA CALAHORRA	Niño
322	C.G.G.	26.01.1992	DÓLAR	Niña
323	A.J.S.	12.03.1992	LA CALAHORRA	Niña
324	G.G.G.A.	12.05.1996	DÓLAR	Niña
325	A.G.A.	28.04.1991	DÓLAR	Niño
326	A.M.P.S.	02.07.2000	FERREIRA	Niña
327	J.J.V.E.	13.03.1997	JEREZ	Niño
328	R.S.V.	23.08.2001	JEREZ	Niño
329	A.T.D.	28.12.2001	JEREZ	Niño
330	A.E.T.	26.02.2002	JEREZ	Niño
331	S.O.T.	17.02.2002	JEREZ	Niña
332	M.V.E.	10.01.1994	JEREZ	Niño
333	B.J.F.	10.08.1990	DÓLAR	Niño
334	M.J.F.	21.03.1997	DÓLAR	Niña
335	M.J.S.V.	29.09.1994	HUENEJA	Niña
336	C.J.M.	05.11.1998	LA CALAHORRA	Niña
337	A.P.S.	19.08.1996	HUENEJA	Niño
338	M.C.G.J.	10.05.2002	HUENEJA	Niña
339	R.G.J.	10.05.2002	HUENEJA	Niña
Total	N	339	339	339

El investigador principal garantizará y respetará la confidencialidad de toda la información registrada acerca de los sujetos del estudio.

### 7.3. Material Clínico y de laboratorio.

**Tabla 7.9.** Relación de material clínico y de Laboratorio

<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termostato PACISA.</li> <li>• Baño termostato Unitronio 320 Selecta.</li> <li>• Espectrofotómetro modelo Photometer 1/2 001M Eppendorf.</li> <li>• Centrífuga Beckman, modelo TJ-6.</li> <li>• Micropipetas automáticas.</li> <li>• Tubos de rosa de vidrio (Pirex).</li> <li>• Tubos de ensayo Trinex.</li> <li>• Tubos de centrífuga de nitrato de celulosa.</li> <li>• Viscosímetro de caída de bola.</li> <li>• Estufa de cultivo.</li> <li>• Tallímetro de Harpenden-Holtain.</li> <li>• Báscula modelo Atlantida.</li> <li>• Antisuero <i>N. meningitidis</i> grupo A, C y B.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Medio de cultivo Mueller-Hinton agar.</li> <li>• Solución de Lugol.</li> <li>• Cristal Violeta.</li> <li>• Fucsina fenicada de Ziehl.</li> <li>• Alcohol-acetona.</li> <li>• Glucosa.</li> <li>• Maltosa.</li> <li>• Lactosa.</li> <li>• Medio de Hugh-Leifson</li> <li>• Reactivo de Kovacs.</li> <li>• Crocin.</li> <li>• 2-amidinopropano.</li> <li>• Medio de Stuart</li> </ul>
---	--

### 7.4. Definición de variables bioquímicas y hematológicas.

Seguidamente se describen las variables estudiadas en el presente proyecto de Tesis doctoral.

7.4.1. **Ferritina:** Es una proteína especializada en el depósito del hierro. Su vida media es de aproximadamente 50 a 75 horas. Se encuentra presente en grandes concentraciones en el hígado, el bazo, la médula ósea y el músculo esquelético. La importancia fundamental de la ferritina es la de poder mantener almacenado el hierro en los tejidos. Las concentraciones en sangre se miden en ngr / dl.

7.4.2. **Hierro:** Es un elemento necesario en el cuerpo para que se forme la hemoglobina. El cuerpo humano contiene normalmente de 3 a 4 gr. de hierro, del que más de la mitad se encuentra en forma de hemoglobina. El hierro es el constituyente de un gran número de enzimas. Definimos la sideremia como el total de hierro férrico circulante en sangre que se encuentran generalmente ligado a la transferrina. Las concentraciones en sangre de hierro sérico libre se miden en mcg/ dl.

7.4.3. **Transferrina:** Es la proteína encargada de transportar el hierro en forma férrica por el torrente sanguíneo. Es sintetizada principalmente en el hígado y tiene una vida media de 8 a 10 días y se encuentra en el plasma saturada con hierro en una tercera parte normalmente. El hierro que se absorbe en los alimentos, es transportado en la sangre por la transferrina y almacenado en ferritina, para ser utilizado en la síntesis de moléculas que contienen hierro como la mioglobina y la hemoglobina. Los valores en sangre se miden en mg/dL.

7.4.4. **Índice de saturación de la Transferrina:** Refleja el porcentaje de hierro que está fijado a la transferrina. En cualquier momento, en un adulto normal, cerca de 33% de los sitios de unión a la transferrina están ocupados por hierro. Un índice de

saturación <15 % equivaldría a una anemia ferropénica. Se consideran valores normales entre el 20 – 50 %.

**7.4.5. Capacidad de saturación de la transferrina:** Es la concentración de hierro necesaria para saturar totalmente la capacidad de transporte de la transferrina. Las concentraciones en sangres se miden en mcg/ dl.

**7.4.6. Hemoglobina:** Es la proteína que transporta el oxígeno a los tejidos. El límite inferior de la normalidad, en adultos es de 13 g/dl en varones y de 12g/dL en mujeres no embarazadas y en niños de 2 a 9 años es de 11.5g/dL e inferior en los de menor edad.

**7.4.7. Leucocitos:** Son un conjunto heterogéneo de células sanguíneas que son los efectores celulares de la respuesta inmunitaria, así intervienen en la defensa del organismo contra sustancias extrañas o agentes infecciosos. Se originan en la médula ósea y en el tejido linfático. Se consideran valores normales entre 3.500 y 11.000/mL.

**7.4.8. Plaquetas:** son las células de la sangre encargadas de la hemostasia, es decir, de cerrar los vasos sanguíneos cuando se produce una herida formando parte del coágulo. Los valores normales oscilan entre 130.000 y 450.000/mL

## 7.5. Recogida de datos somatométricos.

La exploración somatométrica se realizó conforme a los estándares habitualmente recomendados y que a continuación se resumen:

Las determinaciones se realizaron en el brazo izquierdo en los sujetos diestros y en el derecho en los zurdos. Mediante la utilización de las correspondientes ecuaciones (160) se obtuvieron el área grasa y muscular, el cociente adiposo-muscular braquial y el índice de masa corporal, densidad corporal y grasa corporal total.

*a) Peso.* Se utilizó una báscula Atlántida calibrada antes de cada medida. El individuo se coloca encima de la plataforma de la báscula, sin apoyarse en sitio alguno, desprovisto de ropa, a excepción de la ropa interior. Su valor se expresa en Kg con un decimal.

*b) Talla.* La talla se obtuvo con un antropómetro de Harpenden-Holtain. En pie, de manera que sus tobillos, nalgas y hombros estén en contacto con la pieza vertical del aparato medidor. Los tobillos deben situarse juntos, de manera que los maleolos internos contacten o estén muy próximos. Las manos y los brazos deben estar relajados, con las palmas vueltas hacia adentro. La cabeza debe situarse con el plano de Frankfurt paralela al suelo. Se debe deslizar la tabla horizontal del tallímetro hasta tocar la cabeza del sujeto, aplastar el pelo, realizando entonces la medición. Su valor se recoge en cm con un decimal.

*c) Índice de Masa Corporal de Quetelec ( $Peso/Talla^2$ ).* Obtenido mediante el cociente del valor del peso (Kg) y el valor de la talla (m) elevada al cuadrado.

d) *Pliegues cutáneos*. La medición de los pliegues cutáneos es para distintos autores el indicador más fiable del estado nutricional del niño. Se obtiene mediante el calibrador de precisión constante de Holtain con una amplitud de 0 a 45 mm y una presión constante de 10g/mm., por su sensibilidad y precisión, midiendo de esta forma el grosor del tejido adiposo, en las siguientes zonas, siempre de hemicuerpo izquierdo:

- Pliegue tricipital izquierdo. Con el individuo de pie de espaldas al explorador, con los brazos relajados y con las palmas mirando al muslo. Se palpa el acromion y el olécranon y se marca en la piel el punto medio entre ambos. La piel se pellizca en la parte posterior del brazo en la zona del tríceps, aproximadamente 1 cm por encima de la marca, y en la línea vertical que va del acromion al olécranon. El calibrador se coloca a nivel de la marca practicada, manteniendo el pellizco con la mano izquierda durante el tiempo que dura la medición, aproximadamente 1-2 segundos.
- Pliegue bicipital izquierdo. Con el sujeto de cara al explorador con los brazos relajados y la palma de la mano mirando hacia delante. El pellizco se hace en el brazo 1 cm por encima de la línea marcadas por la circunferencia y una línea vertical que une el centro de la fosa antecubital y la cabeza del húmero.
- Pliegue subescapular izquierdo. De pie, con los hombros y los brazos relajados. El pliegue se toma inmediatamente por debajo del ángulo inferior de la escápula en la línea vertical que el mismo determina.
- Pliegue suprailíaco izquierdo. De pie, con los miembros superiores doblados. El pliegue se realiza 1 cm por encima y 2 cm por dentro de la espina suprailíaca anterior.

e) *Perímetro del brazo*. Se midió con una cinta métrica inextensible de 1 cm de diámetro. Con el individuo de pie y con los brazos relajados se toma una línea perpendicular al eje del brazo, equidistante de los dos extremos del húmero: acromion, olécranon. La cinta debe tocar la piel en todo su recorrido, pero no debe comprimir los tejidos.

f) *Cálculo de la Densidad Corporal*. Siguiendo las indicaciones de Brook para los escolares menores de 11 años y las de Durnin y Rahaman para los otros dos grupos de estudio, obtuvimos la densidad corporal en cada caso, mediante la aplicación del logaritmo de la suma de los cuatro pliegues cutáneos, que permite resolver la incógnita (x) perteneciente a cada una de las ecuaciones de regresión.

- **Para niños.**

De 1 a 11 años:  $y = 1.1690 - 0.0788 \times \log \sum 4 \text{ pliegues cutáneos}$

De 12 a 16 años:  $y = 1.1533 - 0.0643 \times \log \sum 4 \text{ pliegues cutáneos}$

- **Para niñas.**

De 1 a 11 años:  $y = 1.2063 - 0.0999 \times \log \sum 4 \text{ pliegues cutáneos}$

De 12 a 16 años:  $y = 1.1369 - 0.0598 \times \log \sum 4 \text{ pliegues cutáneos}$



donde  $y$  = Densidad corporal.

g) *Grasa Corporal total*. Se obtuvo según la ecuación descrita por Brook en 1971 (161).

$$\text{Grasacorporal total (Kg)} = \left[ \left( \frac{4.95}{\text{Densidad corporal}} \right) - 4.5 \right] \times \text{Kg}$$

h) *Área del brazo (cm<sup>2</sup>)*. Se calculó según la ecuación propuesta por Sann en 1988 (162).

$$\text{Área del brazo} = \frac{\text{Perímetro del brazo (cm)}}{4\pi}$$

i) *Área muscular de brazo (cm<sup>2</sup>)*. Se calcula en función de la ecuación descrita por Sann en 1988 (162).

$$\text{Área muscular del brazo} = \frac{(\text{Perímetro del brazo} - \pi \times \text{Pliegue tricipital (cm)})^2}{4\pi}$$

j) *Área grasa del brazo (cm<sup>2</sup>)*. Se calcula en función de la ecuación descrita por Sann en 1988 (162).

$$\text{Área grasadel brazo (cm}^2\text{)} = \text{Área del brazo} - \text{Área muscular del brazo}$$

k) *Índice adiposo muscular*: Se calcula en función de la ecuación descrita por Sann en 1988 (162).

$$\text{IAM} = \frac{\text{Área grasadel brazo}}{\text{Área muscular del brazo}}$$

## 7.6. Encuesta nutricional.

Se utilizó una encuesta de recuerdo de los alimentos consumidos en los últimos 7 días y un registro de frecuencia de consumo. El objeto de esta encuesta es conocer su consumo diario de alimentos y bebidas. Se solicita a los padres del paciente que anote con la mayor precisión posible todos los alimentos y bebidas consumidos en las últimas 24 horas. Puede empezar por el desayuno del día anterior y continuar hasta completar el recuerdo de la dieta de los últimos 7 días. Se le facilita a los padres un listado con los grupos de alimentos que por simplicidad se han resumido en: frutas y verduras, pastas, carne y pescado, lácteos y huevos y bollería. Para facilitar el recuerdo se les recomienda a los padres que escriban inicialmente el menú consumido en cada comida y luego describan detalladamente los ingredientes.

## 7.7. Identificación de portadores de *N. meningitidis*.

*a. Recogida de frotis faringeo.*

Con ayuda de un depresor lingual se pide al niño que abra la boca y con una torunda estéril siguiendo un movimiento circular en la hipofaringe se hace que contacte con amígdalas, paladar blando y faringe posterior, procurando que la torunda no toque los labios se retira de la cavidad oral y se introduce en medio de transporte Stuart (Biomedics, Ltda.), que se mantiene a 37°C hasta su siembra en placa.

La identificación de portadores de *N. meningitidis* se hará siguiendo los pasos del siguiente esquema:

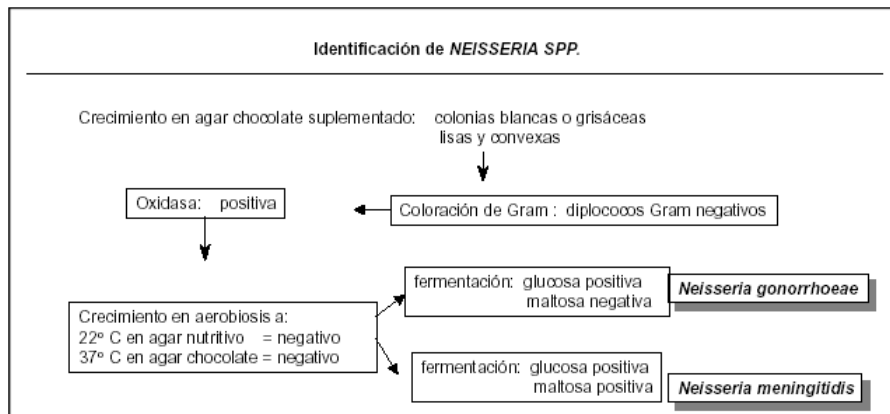
*b. Siembra en Medio Mueller-Hinton-agar.*

Se retira la torunda del medio de transporte y se extiende sobre la superficie de la placa de Petri con medio de cultivo Müller-Hinton, con incubación posterior a 37°C durante 24 horas.

*c. Identificación de colonias blanco-grisáceas.*

*d. Tinción de Gram:* Debemos observar diplococos Gram negativos (coloración rosa). Su realización sigue los siguientes pasos:

1. Preparar los frotis bacterianos.
2. Teñir con cristal violeta: 1min.
3. Lavar con abundante agua el exceso de colorante.
4. Cubrir con Lugol: 1min.
5. Lavar con agua el exceso de Lugol.
6. Decolorar con alcohol-acetona o simplemente con alcohol hasta que la preparación deje de perder color (30seg)
7. Lavar con abundante agua para eliminar el resto de disolvente.
8. Teñir con fucsina fenicada de Ziehl: 1min.
9. Lavar con agua para eliminar el colorante de contraste.
10. Secar la preparación.
11. Examinar al microscopio fijándose sobre todo en el color de cada preparación.



**Figura 7.1.** Pasos a seguir en la identificación de *N. meningitidis*.

*e. Test de Oxidasa.*

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas. La reacción de la oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromooxidasa que activa la oxidación del citocromo que es reducido por el oxígeno molecular que produce agua o peróxido de hidrógeno según la especie bacteriana. El oxígeno actúa por tanto como aceptor final de electrones en la cadena transportadora de electrones. Por lo general, el sistema citocromooxidasa sólo se encuentra en los organismos aerobios, algunos anaerobios facultativos y, excepcionalmente, en algún microaerófilo (*Vibrio fetus*), pero los anaerobios estrictos carecen de actividad oxidasa. Asimismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno (prueba de la catalasa positiva) que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica. La prueba de la oxidasa se usa sobre todo para identificar todas las especies de *Neisseria* (+) y diferenciar *Pseudomonas* de los miembros oxidasa negativos de las enterobacterias.

El reactivo de la oxidasa más recomendado es la solución acuosa al 1% de diclorhidrato de tetrametil-*p*-fenilendiamina (reactivo de Kovacs). Es menos tóxico y mucho más sensible que el correspondiente compuesto dimetilo (reactivo de Gordon y McLeod), pero es más caro. Este reactivo tiñe las colonias oxidasa positivas de color lavanda que vira gradualmente a púrpura-negruzco intenso.

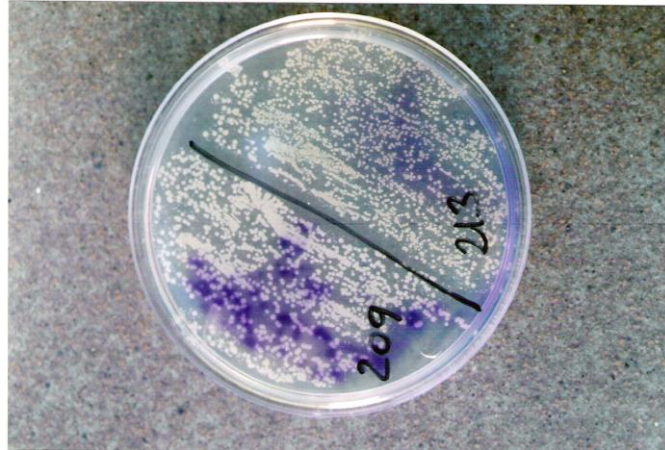
Realización de la prueba:

Método en placa directa:

- Agregar directamente 2-3 gotas de reactivo a algunas colonias. No inundar toda la placa y no invertirla.
- Observar los cambios de color. Con el reactivo de Kovacs la reacción se produce en unos 10-15 segundos, mientras que con el de Gordon y McLeod es dentro de los 10-30 minutos.

Método indirecto sobre papel:

- Colocar un trozo de papel de filtro de 3x3cm aproximadamente en una placa de Petri.
- Agregar 2-3 gotas del reactivo de Kovacs en el centro del papel.
- Extender con el asa de siembra una colonia sobre el papel impregnado.
- La reacción de color positiva se produce a los 5-10 segundos.



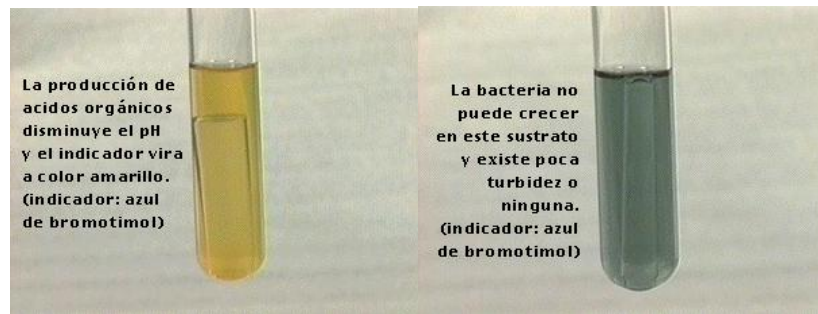
**Figura 7.2.** Test de oxidasa en placa. Las colonias teñidas de color azul son oxidasa positivas.

*f. Fermentación de glucosa y maltosa.*

Es decir medio de Hugh-Leifson positiva y fermentación de lactosa (medio McKonkey) negativa. Los microorganismos sacarolíticos pueden degradar la glucosa por vía fermentativa, oxidativa o ambas. Los productos de la fermentación son ácidos mixtos relativamente fuertes, y fáciles de detectar; los productos de la oxidación son ácidos débiles y necesitan un medio para su detección más sensible: el medio de Hugh-Leifson. La producción de ácido se detecta en el medio por aparición de color amarillo; cuando el microorganismo es oxidativo el viraje de color se observa primero en la superficie del medio. Se inocula el microorganismo por punción. Para realizar las pruebas de fermentación es necesario cerrar los tubos con parafina con objeto de crear un ambiente anaerobio. Su composición es la siguiente:

- Peptona:	2gr
- Glucosa o maltosa:	10gr
- Azul de bromofenol:	0.03gr
- Agar:	2.5gr
- NaCl:	5gr
- Fosfato dipotásico:	0.3gr
- Agua destilada:	1000mL

Para su preparación disolver por calentamiento en un baño de agua; ajustar el pH a 7.1 y distribuir en tubos. Esterilizar en autoclave a 120 °C durante 15 minutos.



**Figura 7.3.** Test de fermentación de azúcar (medio de Hugh-Leifson).

*g. Congelación de las cepas a -40°C.*

Identificadas como *N. meningitidis* en Mueller-Hinton caldo-seroalbúmina (1:1) para su posterior serogrupo.

*h. Determinación del serogrupo de N. meningitidis.*

Los doce serogrupos de *N. meningitidis* basados en el reconocimiento del polisacárido de la cápsula son comúnmente reconocidos como A, B, C, H, I, K, L, W135, X, Y, Z y Z' (29E) –ya no se hace referencia al serogrupo D-. Los brotes epidémicos son causados generalmente por los serogrupos A y C, aunque recientemente se han identificado brotes causados por los serogrupos W135 e Y. El serogrupo B es responsable de la mayoría de los aislamientos en situación de endemia. La seroagrupación es un proceso caro, por ello en nuestro proyecto se ensayaron tres antoseros A, B y C. El método utilizado fue el de seroaglutinación en lámina que requiere una suspensión salina fisiológica formalinizada para hacer la suspensión de *N. meningitidis* y suspensión salina fisiológica no formalinizada para mezclar con el antisuero. El antisuero se mantiene a 4°C mientras no es utilizado. Sobre un portaobjetos previamente limpio con alcohol para desengrasarlo se marcan tres zonas de trabajo con un lápiz grasoso (A, B, C). Se depositan con un asa de siembra una porción de un medio de cultivo fresco en agar sangre en 250 mcL de suero salino formalinizado y se agitan mediante un agitador vibratorio. Tomamos 10 mcL de la suspensión que la transferimos al portaobjetos previamente preparado, agregamos una gota de cada antisuero a cada una de las secciones del portaobjetos y movemos el portaobjetos con movimiento de vaivén durante 1 minuto. Sólo las reacciones fuertes de aglutinación +3 o +4 se leen como positivas. Cuando una cepa reacciona con un solo antisuero se registra como perteneciente a este serogrupo. Cuando una cepa precipita con más de un antisuero o precipita en salina se cataloga como no agrupable.



**Figura 4.** Test de aglutinación en lamina para *N. meningitidis*, con resultados positivo, negativo y control con suero salino.

### 7.8. Determinación de la capacidad antioxidante total del plasma (CATP).

Mediante técnica colorimétrica según la técnica descrita por Lussignoli S. y cols (163) que resumidamente consiste en:

#### *Preparación del crocin:*

- Se diluyen 500 mg de safranina en 20 mL de etiléter, se agita 2 min. y se desecha el sobrenadante. Se repite el procedimiento tres veces y el residuo se evapora al aire.
- Se resuspende en 15 mL de metanol al 30% en agua destilada. Se agita 5 min. a T<sup>a</sup> ambiente. Se recoge el extracto y se pasa por filtro Millipore de 0.45 micras de poro.
- El extracto se diluye 5 veces su volumen en PBS 10 nM. La solución se almacena en alícuotas de 10 mL a -20°C. por un tiempo máximo de 2 meses.

#### *Procesado y medida de las muestras de sangre:*

- Se utiliza sangre obtenida por punción venosa en tubos con EDTA-K. Se centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos. El plasma puede almacenarse durante 1 mes en alícuotas de 200 mcL a -80°C.
- Se prepara una disolución de 2-amidinopropano (ABAP) en PBS 10 nM, 5 mg/mL, antes de su uso.
- Las medidas se realizan en espectrofotómetro a 450 nm. Se prepara el blanco con 100 mcL de la solución de crocin + 100 mcL de PBS 10 nM.
- Las muestras de plasma 50 mcL (diluciones 1, 1:2, 1:10) se añaden a 100 mcL de ABAP, se incuban 1 h. a 37°C.
- Porcentaje de inhibición de crocin:  $\% = \frac{d.o.blanco - d.o.muestra}{d.o.blanco}$
- Se refiere el porcentaje de inhibición de crocin al porcentaje de inhibición de Trolox C en mg.

## 7.9. Procesado de muestras sanguíneas.

Tanto a los individuos identificados como casos o controles se les efectuó una extracción sanguínea. Se utilizó EDTA-K como anticoagulante. Los recuentos de hematíes, leucocitos y plaquetas se realizaron con un contador globular (Coulter electronics) y las determinaciones de hierro y transferrina se realizaron con técnicas colorimétricas.

## 7.10. Estrategias de búsqueda de información.

Para realizar la búsqueda bibliográfica utilizamos varias bases de datos automatizadas. Inicialmente acudimos a Medline a la que accedemos a través de PubMed, según las estrategias de búsqueda que figuran que seguidamente se detallan. Revisamos así mismo en el Catálogo Colectivo de Publicaciones Periódicas de las Bibliotecas de Ciencias de la Salud Españolas (<http://www.isciii.es/c17>) y la Base de Datos de Tesis Doctorales (<http://www.mcu.es/TESEO>). Sobre la base las preguntas de investigación planteadas hemos desarrollado una serie de términos de búsqueda de información utilizando para ello el vocabulario MeSH (Medical Subject Headings) utilizado para indicar los registros de Medline y otras bases de datos informatizadas; acudimos para ello de PubMed (<http://www.pubmed.gov>) desde el menú PubMed database y MeSH Browser (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/2003/MBrowser.html>). Acudimos también al vocabulario de Descriptores de Ciencias de la salud (DeCS), versión adaptada al castellano del MeSH, que puede resultar útil como lenguaje de búsqueda de fuentes en castellano (<http://decs.bvs.br/E/homepagee.htm>). Los términos MeSH y DeCS para cada una de las preguntas de investigación formuladas: Antioxidants, lipid peroxidation, oxidative stress, diet, growth.

## 7.11. Análisis estadístico.

La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* se calculó de forma global en la cohorte de estudio. Posteriormente se procedió a un análisis descriptivo de las variables, cálculo de la media e intervalos de confianza 95%. Inferencia estadística mediante la comparación de medias para variables independientes, análisis de regresión lineal y regresión logística. Todos los cálculos se realizaron con el paquete estadístico SPSS 12.

### 7.11.1. Estadística descriptiva.

#### 7.11.1.1. Medidas de centralización.

Con el fin de dar una idea aproximada de los valores más representativos de un conjunto de datos se utilizan, en estadística, las **medidas de centralización**. Se definen como aquellos valores que tienden a situarse en el centro del conjunto de datos ordenados respecto a su magnitud. Las distintas medidas de centralización son la media aritmética, la mediana y la moda, las dos primeras de las cuales hemos utilizado en nuestro estudio. A continuación pasamos a describirlas y detallarlas:

- i. Media aritmética: se trata de una medida de centralización de tamaño. La media aritmética de un conjunto de datos es el valor medio que los representa. Sus características son las siguientes:

- ii. Es un valor numérico que está entre el menor y el mayor de un conjunto de datos.
- iii. Puede no coincidir con ninguno de los datos y ser un número decimal.
- iv. Sólo se puede obtener con datos cuantitativos.

La media aritmética de un conjunto de datos se obtiene dividiendo la suma de los datos por el número total de ellos, o bien, si los datos vienen en una tabla con sus frecuencias absolutas  $f_i$ , se multiplica cada dato  $x_i$  por su frecuencia y se suman los resultados obtenidos. Este resultado se divide por el número total de datos  $N$ .

$$\bar{X} = \frac{\sum f_i x_i}{\sum f_i} = \frac{f_1 x_1 + f_2 x_2 + f_n x_n}{f_1 + f_2 + f_n} = \frac{f_i x_i}{N}$$

- v. **Mediana:** es una medida de centralización de posición. En un conjunto de datos ordenados de menor a mayor, la mediana es aquel valor que ocupa una posición media en la distribución estadística. Si el conjunto de datos tiene un número de valores impar, se ordenan en orden creciente y la mediana es el término que ocupa el lugar central; si, por el contrario, el conjunto de datos es par, la mediana es la media aritmética de los valores centrales. Su cálculo se realiza según la siguiente fórmula:

$$M = L_i + \left( \frac{\frac{N}{2} - (\sum f)_i}{f_{\text{mediana}}} \right)$$

donde  $L_i$  es el límite inferior real de la clase mediana,  $N$  es el número total de datos,  $(\sum f)_i$  es la suma de las frecuencias absolutas de todas las clases anteriores a la clase mediana y  $f_{\text{mediana}}$  es la frecuencia absoluta de la clase mediana.

#### 7.11.1.2. Medidas de dispersión.

En ocasiones el conocimiento de los valores centrales de una muestra no es suficiente, y es preciso conocer en qué medida los datos numéricos están agrupados o no alrededor de la media. Este hecho se conoce como **dispersión**. De esta forma, para medir el grado de dispersión que existe en la distribución se utilizan las **medidas de dispersión**. En nuestro estudio hemos utilizado las siguientes medidas de dispersión:

- vi. **Error estándar de la media:** es la media aritmética de las diferencias, tomadas en valor absoluto, entre los valores de cada observación y su media aritmética.
- vii. **Desviación típica:** se conoce también como **desviación estándar** o **desviación cuadrática** de la media. La desviación típica nos informa sobre la dispersión de los datos respecto al valor de la media; cuanto mayor sea su valor, más dispersos



estarán los datos. Se calcula como la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media, según la siguiente fórmula:

$$\bullet \quad S = \sqrt{\frac{\sum f_i (x_i - \bar{x})^2}{N}}$$

viii. Varianza: se define como el cuadrado de la desviación típica. La varianza es una variable estadística que mide la dispersión de los valores respecto a un valor central (media), es decir, la media de las diferencias cuadráticas de las puntuaciones respecto a su media aritmética. Se calcula de la siguiente forma.

$$\bullet \quad S^2 = \frac{\sum f_i (x_i - \bar{x})^2}{N}$$

ix. Rango: se define como la medida de dispersión que surge de la diferencia entre el valor máximo y mínimo del conjunto de datos, según la siguiente fórmula:

$$\bullet \quad R = X_{\text{máx.}} - X_{\text{mín.}}$$

x. Amplitud intercuartil: los cuartiles resultan de dividir la distribución en cuatro partes iguales. Así, el primer cuartil (Q1) deja por debajo de él una cuarta parte de las mediciones y tres cuartas partes por encima, mientras que el tercer cuartil (Q3) deja por debajo de este valor las tres cuartas partes de las mediciones y una cuarta parte por encima. Así, la amplitud intercuartil se define como la distancia que hay entre el tercer cuartil y el primer cuartil, según la siguiente fórmula:

$$\text{Amplitud intercuartil} = Q3 - Q1$$

### 7.11.1.3. Medidas de forma.

Además de las medidas de centralización y de dispersión conviene al estudiar una distribución conocer su forma mediante un índice lo más simplificado posible. En el presente estudio hemos utilizado como medida de forma el **sesgo**, también denominado **asimetría** o **curtosis**. Se define como la mayor o menor simetría o asimetría de una distribución. Al hablar de curtosis nos referimos al grado de "apuntamiento" de una distribución. Generalmente, se compara el mayor o menor apuntamiento de una distribución con la curtosis de la distribución normal, por lo que viene expresado como:

$$\gamma_2 = \frac{m_4}{s^4} - 3$$

De esta forma, el coeficiente de curtosis es nulo para una distribución normal. Si es negativo se trata de una distribución menos apuntada que la normal y recibe el nombre de **planicúrtica**. Si es positivo se trata de una distribución más apuntada que la

normal y recibe el nombre de **leptocúrtica**. A las distribuciones con coeficientes de curtosis nulo se les denomina **mesocúrticas**.

#### 7.11.1.4. Pruebas de normalidad.

La **prueba de Kolmogorov-Smirnov** de una muestra es una medida de bondad de ajuste. Esto es, se interesa en el grado de acuerdo entre la distribución de un conjunto de valores de la muestra y alguna distribución teórica específica. Determina si razonablemente puede pensarse que las mediciones muestrales provengan de una población que tenga esa distribución teórica. En la prueba se compara la distribución de frecuencia acumulativa de la distribución teórica con la distribución de frecuencia acumulativa observada. Se determina el punto en el que estas dos distribuciones muestran la mayor divergencia.

En esta prueba se determina el grado de concordancia entre la distribución de frecuencia muestral y la distribución de frecuencia teórica, bajo la hipótesis nula de que la distribución de la muestra es  $f_0(x,q)$  e interesa probar que no existe diferencia significativa. En la prueba de Smirnov-Kolmogorov se está interesado en la mayor desviación entre la función de distribución teórica y la empírica, es decir entre  $F_0(x)$  y  $S_n(x)$ , para todo el rango de valores de  $x$ . Bajo la hipótesis nula se espera que estas desviaciones sean pequeñas y estén dentro de los límites de errores aleatorios.

La **prueba de Shapiro-Wilks** es menos conocida que la anterior, es la que se recomienda para contrastar el ajuste de nuestros datos a una distribución normal, sobre todo cuando la muestra es pequeña ( $n < 30$ ). Mide el ajuste de la muestra a una recta, al dibujarla en papel probabilístico normal.

En escala probabilística normal se representa en el eje horizontal, para cada valor observado en nuestros datos, la función de distribución o probabilidad acumulada observada, y en el eje vertical la prevista por el modelo de distribución normal. Si el ajuste es bueno, los puntos se deben distribuir aproximadamente según una recta a  $45^\circ$ .

#### 7.11.1.5. Representación gráfica. Boxplot.

El gráfico de caja, conocido con el nombre de **boxplot** o **box and whisker plot**, es una representación basada en un rectángulo, la caja, en cuyos extremos se añaden unas líneas o bigotes. Esta gráfica informa sobre la tendencia central, forma y asimetría, y sobre la existencia de valores atípicos.

Para construir un boxplot, se construye un rectángulo sobre uno de los ejes, cuya longitud es igual a la amplitud intercuartil cuyos extremos se sitúan en los valores correspondientes al primer cuartil,  $Q_1$ , y el tercer cuartil,  $Q_3$ .

En el interior de la caja está situado el 50 % central de los valores de la variable, y fuera el 50 % restante. Se marca en el interior de la caja, con una línea, el lugar del valor de la mediana, y ésta divide la caja en dos partes, del 25 % de los valores.

A continuación se representan los bigotes, a ambos lados de la caja, cuya longitud a partir de los extremos de la caja debe ser igual a 1,5 veces la amplitud intercuartil si hay valores de la variable superiores a este límite; si no es así, el extremo

de cada bigote coincide con los valores mínimo y máximo, respectivamente, de la variable representada.

Si la variable es, aproximadamente, simétrica, los bigotes tendrán una longitud similar; si la variable tiene una acumulación de valores a uno de los lados, los bigotes no tendrán la misma longitud y uno será más largo que el otro.

### 7.11.2. Contraste de hipótesis.

#### 7.11.2.1. Test de comparación de dos medias independientes (*t* de Student).

Aceptada la hipótesis de la normalidad, empleamos test paramétricos para la comparación de dos medias a partir de dos tipos de muestras diferentes:

Dadas dos muestras de tamaño  $n_1$  y  $n_2$ , con  $X_1$  y  $X_2$  de medias muestrales; al tratarse de muestras independientes la variable  $X_1 - X_2$  tendría por media la diferencia de las medias y por varianza la suma de las varianzas. Por tanto, se cumpliría que:

$$\bar{x}_1 - \bar{x}_2 \rightarrow \left( \mu_1 - \mu_2; \sqrt{\frac{\xi_1^2}{n_1} + \frac{\xi_2^2}{n_2}} \right)$$

En consecuencia, puede resumirse la regla del test de la siguiente forma:

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{x}_1 - \bar{x}_2|}{\sqrt{\frac{\xi_1^2}{n_1} + \frac{\xi_2^2}{n_2}}}$$

Comparada con una  $t_a$  en la distribución T de Student. Si la  $t_{\text{exp}}$  es menor o igual que  $t_a$ ...se acepta la hipótesis nula (las medias son iguales); si  $t_{\text{exp}}$  es mayor que  $t_a$  se acepta la hipótesis alternativa (las medias son distintas), y un error  $\alpha$

#### 7.11.2.2. Recta de regresión lineal y coeficiente de correlación.

Partiendo de “n” valores pares de valores cuantitativos  $(x_1, y_1)$ ,  $(x_2, y_2)$ ,  $(x_n, y_n)$ , pertenecientes a una muestra de n individuos, en los cuales  $(x_i)$  corresponden a una variable e  $(y_i)$  a otra, se puede obtener una nube de puntos sencillamente representando en un sistema de ordenadas, los valores correspondientes a cada uno de los pasos citados. Concuera la ecuación de la recta de regresión de y sobre x:

$$y - \bar{y} = \frac{s_{xy}}{s_x^2}(x - \bar{x})$$

en la que  $S^2_x$  es la varianza de los valores muestrales  $x_1, x_2, \dots, x_n$ ,  $y$ ,  $s_{sxy}$  la covarianza, que se obtiene según el cálculo siguiente:

$$s_{xy} = \frac{\sum (x_i - \bar{x})(y - \bar{y})}{n}$$

con una pendiente igual a:

$$\frac{s_{xy}}{s_x^2}$$

y un valor correspondiente a la ordenada en el origen, que se obtendrá adjudicando a  $x$  el valor cero, quedando la recta:

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x^2 \bar{x}}$$

Para medir el grado de relación entre las variables se utiliza el coeficiente de correlación de Pearson, que corresponde a la siguiente expresión:

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x s_y}$$

Para conocer la dependencia/independencia de las variables a partir del coeficiente de correlación ( $r$ ) se parte de un test de hipótesis en el que:

$H_0$   $r=0$  (independiente).

$H_1$   $r \neq 0$  (dependiente).

Obteniéndose una

$$t_{\text{exp}} = \sqrt{\frac{(n-2)r^2}{1-r^2}}$$

donde ( $n$ ) no es el número de parejas y ( $r$ ) la correlación muestral, que se contrastara con una  $t_{\alpha}$  (teórica con  $(n-2)$  grados de libertad y las variables  $x$  e  $y$  son independientes en un error alfa).

De manera que si:

$$t_{\text{exp}} > t_{\alpha}; r = 0$$

El modelo de regresión lineal también se puede presentar en dos etapas muy bien diferenciadas: una descriptiva y otra inferencial. La regresión lineal como técnica descriptiva consiste en realizar un procedimiento matemático de mínimos cuadrados para hallar la ecuación de la recta que mejor se ajuste a los datos, esta recta recibe el nombre de recta de regresión. La vertiente inferencial, supone que los datos son una muestra al azar y permite evaluar si en la población las variables están relacionadas y en caso afirmativo, estimar la recta de regresión que mejor predice la variable dependiente. Debido a la variabilidad de los datos, existe una diferencia entre los valores estimados por la recta de regresión para la variable dependiente a unos valores dados de la variable

independiente y los valores observados en la realidad; esta diferencia se conoce con el nombre de residual. Este error o residual equivale a:

$$e_i = y_i - \bar{y}_i = y_i - (a + bx_i)$$

Para hallar la recta de regresión primero se debe establecer un criterio de ajuste y luego se determina los coeficientes a y b de esta recta, de manera que cumpla los criterios establecidos. Utilizando el criterio de mínimos cuadrados y disponiendo de la matriz de datos con n pares de valores  $(x_i; y_i)$ , se trata de determinar los coeficientes a y b de la recta de ajuste  $y=a+bx$  que hagan la mínima suma de los residuales al cuadrado.

Los valores a y b que minimizan esta función se hallan aplicando un teorema fundamental de cálculo infinitesimal:

$$\frac{\delta}{\delta a} \sum [y_i - (a + bx_i)]^2 = \sum_{i=1}^n 2[y_i - a - bx_i](-1) = 0$$

$$\frac{\delta}{\delta b} \sum [y_i - (a + bx_i)]^2 = \sum_{i=1}^n 2[y_i - a - bx_i](-x_i) = 0$$

Despejando a y b se obtiene:

$$a = \sum \frac{y_i}{n} - b \sum \frac{x_i}{n} = \bar{y} - b\bar{x}$$

$$b = \frac{\sum x_i y_i - \sum x_i \sum \frac{y_i}{n}}{\sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n}} = \frac{SP_{xy}}{SC_x}$$

Donde  $SP_{xy}$  equivale a la suma de productos cruzados:  $\sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$ .

y  $SC_x$  equivale a la suma de cuadrados:  $\sum (x_i - \bar{x})^2$

#### 7.11.2.3. Test de Chi cuadrado. Prueba de Mantel-Haenszel.

Analizar la distribución de una variable con relación a otra u otras es una tarea corriente en Salud Pública, vinculada, la mayoría de las veces, a la búsqueda de un patrón que indique la relación, (o la falta de ella) entre las variables estudiadas. Este es un proceso clave en la identificación de las posibles causas de los problemas de salud, y también de factores que resulten estar asociados con las variables consideradas dependientes en nuestro estudio. El estudio de la influencia de una variable (variable independiente) sobre la forma en que se modifica otra (variable dependiente) es conocido como análisis bivariado; y será multivariado cuando el estudio evalúe de forma simultánea el efecto sobre una variable dependiente de dos o más variables independientes.

Las tablas de contingencia (tablas de doble entrada) son una herramienta fundamental para este tipo de análisis. Están compuestas por filas (horizontales), para la información de una variable y columnas (verticales) para la información de otra variable. Estas filas y columnas delimitan *celdas* donde se vuelcan las frecuencias de cada combinación de las variables analizadas. Ocasionalmente, por su estructura teórica, el problema analizada permite hablar de una variable dependiente y de variables independientes. Salvo en situaciones muy especiales, la simple inspección de la información contenida en las tablas de contingencia no permite ser concluyente sobre

cuál de la hipótesis es la que ha de elegirse como válida (ausencia o presencia de asociación). Las pruebas de significación estadística que acompañan el análisis basan su examen en comparar los resultados observados con los esperados (bajo el supuesto de que no hay asociación). Cuanto mayor sea la diferencia entre la distribución observada y la esperada, menos razonable es suponer que la distribución observada sea solo producto del azar. El cálculo de los valores esperados se realiza usando los valores marginales de la tabla, asumiendo que la probabilidad para cada categoría es la misma que la de todo el grupo y que no existe asociación entre las variables estudiadas.

La relación entre un factor de riesgo (supuesto o real) y un efecto es en ocasiones “modificada” por la presencia de un tercer factor. Esta situación, conocida como *efecto de confusión*, podría definirse como la que producen aquellos factores que, estando relacionados con el factor de riesgo en estudio, condicionan la aparición del efecto (siempre que no se trate de un factor que se halle en el trayecto causal que va del factor de riesgo al daño, en cuyo caso hablaríamos de variable intermedia). El análisis individual de cada estrato debe ser complementado con un análisis que estime el efecto general considerando los valores de cada estrato. El método de Mantel-Haenszel es uno de los más útiles para este análisis. La existencia de diferencias entre los resultados de un análisis no estratificado y uno estratificado indica que el factor por el que se estratifica ejerce un efecto de confusión en la relación que exhiben los factores estudiados. Los resultados incluyen una tabla global (suma de los estratos), el *odds ratio* e intervalo de confianza (calculado según el método de Woolf) para cada estrato, el *odds ratio* de la tabla global (*odds ratio* crudo) y el *odds ratio* combinado (método de Mantel-Haenszel) y ponderado por el método del inverso de la varianza.

#### 7.11.2.4. Regresión no lineal. Regresión logística.

No siempre está justificado el intentar sustituir una nube de puntos obtenida al estudiar la relación existente entre dos variables por una recta que represente el fenómeno biológico que se analiza, ya que multitud de fenómenos no se ajustan a ecuaciones lineales rectilíneas y siguen, preferentemente, otro tipo de curvas de ecuaciones más o menos complejas.

El estudio de la regresión no lineal presenta dos partes diferenciadas: la primera, la selección de la forma general de curva teórica que se pretende ajustar a los resultados del experimento, y la segunda, la aplicación, una vez seleccionada, del procedimiento de los mínimos cuadrados para determinar los coeficientes de la curva. La primera parte consiste en elegir, de entre las ecuaciones generales de curvas habituales que estudia la geometría analítica aquella que, por su forma cualitativa, piense el investigador que presenta una semejanza o tendencia más parecida con la nube experimental de puntos obtenida en el ensayo real. La observación detenida de esta nube o diagrama de dispersión permitirá decidir la forma de qué tipo de curva sigue su tendencia o desarrollo.

La **regresión logística** viene definida por la existencia de una variable dependiente con dos categorías y una o más variables independientes que pueden ser tanto categóricas como cuantitativas.

En ocasiones el modelo de regresión logística precisa incluir como variable dependiente más de dos categorías ( $c$ ); en este caso se definen  $c-1$  logit o ecuaciones

simultáneas, cada uno de ellos comparando una determinada categoría con la definida como de referencia, que en el caso particular de la regresión logística multinomial debe ser la categoría de valor más bajo.

$$\text{Logit}(Y = s) = \ln \left( \frac{\Pr(Y = s)}{1 - \Pr(Y = 0)} \right) = \beta_{0s} + \beta_{1s}x$$

Es importante tener claro que el modelo más simple de esta regresión, donde la variable independiente es categórica binaria, equivale a una tabla de contingencia ( $\chi^2$ ). Sin embargo el modelo se va a ir complicando conforme añadamos categorías a la variable independiente o introduzcamos un predictor (variable independiente) cuantitativo.

La regresión logística ordinal supone asumir que las categorías de la variable dependiente tienen un orden dado, lo que supone una información que desestimaríamos si la considerásemos solo como una variable cuantitativa (regresión lineal) o categórica no binaria (multinomial). Este tipo de regresión no supone definir logits respecto a una categoría de referencia, sino que se trabaja con una categoría no representada y codificada con el valor mayor. Para que la categoría de referencia sea la más baja debe recodificarse.

Se han desarrollado varios modelos de regresión ordinal que difieren entre sí en la manera en que definen los logits de respuesta, a saber:

- xi. Modelo de odds proporcionales o modelo de odds acumulativas.
- xii. Modelo de razones de continuidad.
- xiii. Modelo de categorías adyacentes.

De ellos, el más usado es el modelo de odds proporcionales. En él, la  $\Pr(Y \leq s)$  se denomina **probabilidad acumulativa** de la respuesta  $s$ ; lo que permite definir la **odds acumulativa** de la respuesta  $s$ :

$$\left( \frac{\Pr(Y \leq s)}{1 - \Pr(Y \leq s)} \right)$$

$$\text{Logit}(Y \leq s) = \ln \left( \frac{\Pr(Y \leq s)}{1 - \Pr(Y \leq s)} \right) = \alpha_s + \beta_1$$

A la hora de interpretar los parámetros de un modelo de odds proporcionales hay que tener presente la particular definición de probabilidad realizada, que contrapone probabilidades inferiores o iguales a un valor de respuesta *versus* las superiores al mismo. El valor  $e^\beta$ , siendo  $\beta$  el coeficiente de estimación obtenido, es la razón de odds acumulativas entre una y otra categoría de la variable independiente. La significación global del modelo se obtiene mediante la prueba de razón de verosimilitud global, mientras que la significación individual de los parámetros del modelo se obtiene mediante la prueba de Wald o mediante la prueba de razón de verosimilitud parcial.





## **8. RESULTADOS**



## RESULTADOS

### 8.1. Análisis descriptivo.

En este apartado se hace un repaso de las características fundamentales de cada distribución de variables incluidas en nuestro estudio.

#### 8.1.1. Descripción estadística de la cohorte de estudio.

En las Tablas siguientes se muestra la descripción de los principales estadígrafos para las variables cuantitativas incluidas en este proyecto. Las hemos agrupado en función del sexo de los niños, lo cual está especialmente indicado para las variables somatométricas. Más adelante categorizaremos las variables por edad.

**Tabla 8.1.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables peso, talla, pliegue tricípital (PIT), pliegue bicípital (PIB), pliegue subescapular (PISe), pliegue suprailiaco (PISi) y perímetro braquial en niños.

	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Talla (cm)</b>	<b>PIT (mm)</b>	<b>PIB (mm)</b>	<b>PISe (mm)</b>	<b>PISi (mm)</b>	<b>PB (cm)</b>
Media (DS)	29.8 (14.8)	123.9 (23.8)	12.4 (7.58)	7.13 (0.72)	9.05 (5.77)	8.72 (7.84)	19.08 (4)
Intervalo confianza 95%, media	27.6- 31.9	120.4- 127.4	11.3- 13.5	5.7-8.56	8.2-9.8	7.59-9.86	18.5-19.6
Error estándar media	1.09	1.7	0.55	0.72	0.42	0.57	0.29
Mediana	28	127	10	2	7	5	18
Varianza	220.1	570.6	57.5	97.2	33.3	61.5	16
Valor mínimo	9	67	4	2	4	3	13
Valor máximo	91	174	78	135	34	41	32
Asimetría	1.06	-0.17	4.14	11.9	2.2	1.78	0.07
Error estándar asimetría	1.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17	0.17
Curtosis	1.32	-0.83	30.1	155.6	5.3	2.46	2.0
Error estándar curtosis	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
Amplitud intercuartil (IQC)	20	39	7	4	5	6	6
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0.10 (0)	0.07 (0,01)	0.16 (0,001)	0,33 (0)	0,25 (0)	0.26 (0)	0,13 (0)
Percentiles 10 - 90	13-50	90-152	6.6-21	4-11	5-16.4	3-22.8	15-24

En relación a la variable “Peso” deben destacarse las amplias desviaciones estándar encontradas. La estimación de asimetría con un error estándar mayor que el valor medio de asimetría nos hace asumir una distribución con valores extremos con cola marcada hacia la derecha. El peso medio de la muestra fue de 29.8 kg para los niños y 27.6 para las niñas.

En relación a la “Talla” deben tenerse en cuenta las siguientes consideraciones: en primer lugar la coincidencia de los valores medios de la distribución de niñas con la mediana de cada distribución; por otro lado, en el grupo de niños, la distribución tienen una curtosis negativa, lo que es indicativo de distribuciones poco apuntadas o platicúrticas. La talla media global fue de 123.9 cm, con un valor máximo de 174 cm para los niños y mínimo de 67 cm para los niños.

**Tabla 8.2.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables peso, talla, pliegue tricúrtico (PIT), pliegue bicúrtico (PIB), pliegue subescapular (ISe), pliegue suprailiaco (PISi) y perímetro braquial en niñas.

	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Talla (cm)</b>	<b>PIT (mm)</b>	<b>PIB (mm)</b>	<b>PISe (mm)</b>	<b>PISi (mm)</b>	<b>PB (cm)</b>
Media (DS)	27.6 (15.7)	119.5 (26)	13.2 (5.77)	7.03 (2.63)	9.93 (6.47)	9.57 (8.91)	18.7 (3.55)
Intervalo confianza 95%, media	25.1- 30.2	115.3- 123.7	12.3- 14.1	6.61- 7.46	8.8-10.9	8.14-11	18.1-19.2
Error estándar media	1.28	2.11	0.47	0.21	0.52	0.72	0.28
Mediana (DS)	23	120	12	7	7	6	18
Varianza	248.6	676.2	33.3	6.93	41.9	79.4	12.6
Valor mínimo	8	74	6	3	4	3	14
Valor máximo	81	168	36	18	38	72	28
Asimetría	1.04	-0.08	1.25	1.52	2.36	3.41	0.79
Error estándar asimetría	0.17	0.17	0.19	0.19	0.19	0.19	0.19
Curtosis	0.74	-1.02	1.43	3.11	5.7	16.94	-0.18
Error estándar curtosis	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39	0.39
Amplitud intercuartil (IQC)	20	42	7	3	5	6	5
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,13 (0)	0,08 (0)	0,14 (0)	0,20 (0)	0,22 (0)	0,23 (0)	0,18 (0)
Percentiles 10 - 90	11-529	80-153	7-22.8	4-10.8	5-18.8	4-19.8	15-24

**Tabla 8.3.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables Índice de masa corporal (IMC), Área muscular del brazo (AMB), Área grasa del brazo (AGB), Índice adiposo muscular (IAM), Densidad corporal (DC), Grasa corporal total (GCT) en niños.

	<b>IMC (Kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>AMB (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>AGB (cm<sup>2</sup>)</b>	<b>IAM</b>	<b>DC</b>	<b>GCT (Kg)</b>
Media (DS)	18.2 (3.56)	6.7 (3.1)	19.06 (8.7)	6.2 (12.4)	1.05 (0.009)	4.52 (2.82)
Intervalo confianza 95%, media	17.7-18.7	6.2-7.3	17.5-20.5	4.08-8.3	1.05-1.06	4.04-5
Error estándar media	0.26	0.2	0.75	1.07	0.0007	0.24
Mediana (DS)	17	7.1	16.6	2.28	1.06	3.6
Varianza	12.7	9.8	76.7	156	0	7.9
Valor mínimo	12.9	0.25	5.8	0.6	1.03	1.09
Valor máximo	33.2	16	50.8	90.4	1.08	17.5
Asimetría	1.67	-0.08	1.16	4.5	-0.68	1.89
Error estándar asimetría	0.17	0.2	0.20	0.2	0.20	0.2
Curtosis	3.52	-0.43	1.36	23.1	1.09	4.7
Error estándar curtosis	0.35	0.41	0.41	0.41	0.41	0.41
Amplitud intercuartil (IQC)	4.3	4.2	10	3.6	0.01	2.8
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0.14 (0)	0,09 (0)	0,14 (0)	0,32 (0)	0.08 (0.02)	0.15 (0)
Percentiles 10 - 90	14.7-19.8	2.5-10.7	10.2-31.4	1.1-12.1	1.04-1.06	2.06-8.6

Las variables pliegue bicipital y tricípital muestran distribuciones marcadamente leptocúrticas mientras las variables pliegue subescapular y suprailíaca son más mesocúrticas.

Para las variables Índice de masa corporal (IMC), Área muscular del brazo (AMB), Área grasa del brazo (AGB), Índice adiposo muscular (IAM), Densidad corporal (DC), Grasa corporal total (GCT) en niños, llama la atención la constatación de que las distribuciones de IAM son marcadamente leptocúrticas tanto en niños como en niñas. La mediana para el índice de masa corporal tanto en niños como en niñas oscila entre 16-17 Kg/m<sup>2</sup>, con valores máximos superiores a 30 Kg/m<sup>2</sup>, en ambos grupos.

**Tabla 8.4.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables Índice de masa corporal (IMC), Área muscular del brazo (AMB), Área grasa del brazo (AGB), Índice adiposo muscular (IAM), Densidad corporal (DC), Grasa corporal total (GCT) en niñas.

	IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	AMB (cm <sup>2</sup> )	AGB (cm <sup>2</sup> )	IAM	DC	GCT (Kg)
Media (DS)	17.6 (3.46)	5.16 (2.8)	18.07 (7.27)	10.8 (19.5)	1.06 (0.009)	3.77 (2.69)
Intervalo confianza 95%, media	17.1-18.2	4.6-5.7	16.63- 19.5	6.99-14.7	1.05-1.06	3.2-4.3
Error estándar media	0.28	0.28	0.72	1.95	0.0009	0.26
Mediana (DS)	16.5	5.5	17.1	3.07	1.06	2.9
Varianza	12	7.9	52.88	383.3	0	7.26
Valor mínimo	13.2	0.25	7.3	0.9	1.04	0.79
Valor máximo	30.8	11.3	41.4	90.4	1.08	15.6
Asimetría	1.49	-0.2	0.86	2.6	-0.29	1.73
Error estándar asimetría	0.19	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
Curtosis	2.17	-0.94	0.76	6.5	-0.45	3.76
Error estándar curtosis	0.39	0.47	0.47	0.47	0.47	0.47
Amplitud intercuartil (IQC)	3.8	4.17	10	7.24	0.01	2.96
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0,1 (0.01)	0,105 (0.09)	0,10 (0)	0,33 (0)	0,089 (0.04)	0,14 (0)
Percentiles 10 - 90	14.1-18.2	0.66-8.39	9.59-29	1.17-27.5	1.04-1.07	1.28-7.68

La relación IMC/Aox y GCT/Aox nos da una idea del nivel de antioxidantes plasmáticos para una determinada masa corporal o una estimación dada de grasa corporal. Es llamativo que para un nivel dado de Aox la GCT es mayor en niñas que en niños, en tanto el IMC es mayor en niños que en niñas para un nivel dado de Aox. En todos los casos las distribuciones son platicúrticas.

Las variables hematológicas recuento de hematíes (RBC), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), recuento leucocitos, polimorfonucleares (PMN), linfocitos y plaquetas siguen en su mayoría distribuciones asimétricas con colas apuntadas por la derecha y distribuciones platicúrticas, aunque para el recuento de plaquetas en niñas la distribución es marcadamente leptocúrtica.

**Tabla 8.5.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables: cociente índice de masa corporal/capacidad antioxidante total del plasma (IMC/Aox), grasa corporal total/capacidad antioxidante total del plasma (GCT/Aox) en niños y niñas.

	Niños		Niñas	
	IMC/Aox	GCT/Aox	IMC/Aox	GCT/Aox
Media (DS)	154.4 (110.3)	41.5 (43)	123.1 (216)	76.9 (195.9)
Intervalo confianza 95%, media	104-204	21.9-61.1	-7.6-254	-41.4-195.4
Error estándar media	24	9.38	60.06	54.3
Mediana (DS)	122.8	25.5	47	17.4
Varianza	12167	1849	46898	38407
Valor mínimo	4.09	0.63	10.8	1.79
Valor máximo	395	158	821	725
Asimetría	0.84	1.66	3.2	3.5
Error estándar asimetría	24.07	0.5	0.61	0.61
Curtosis	0.05	2.11	10.9	12.6
Error estándar curtosis	0.97	0.97	1.19	1.19
Amplitud intercuartil (IQC)	124	39.2	122	29
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,16 (0.15)	0,27 (0.00)	0,34 (0)	0.42 (0)
Percentiles 10 - 90	13.9-355	2-122.9	10.9-559	2.1-466

**Tabla 8.6.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables hematológicas: recuento de hematíes (RBC), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), recuento leucocitos, polimorfonucleares (PMN), linfocitos y plaquetas en niños.

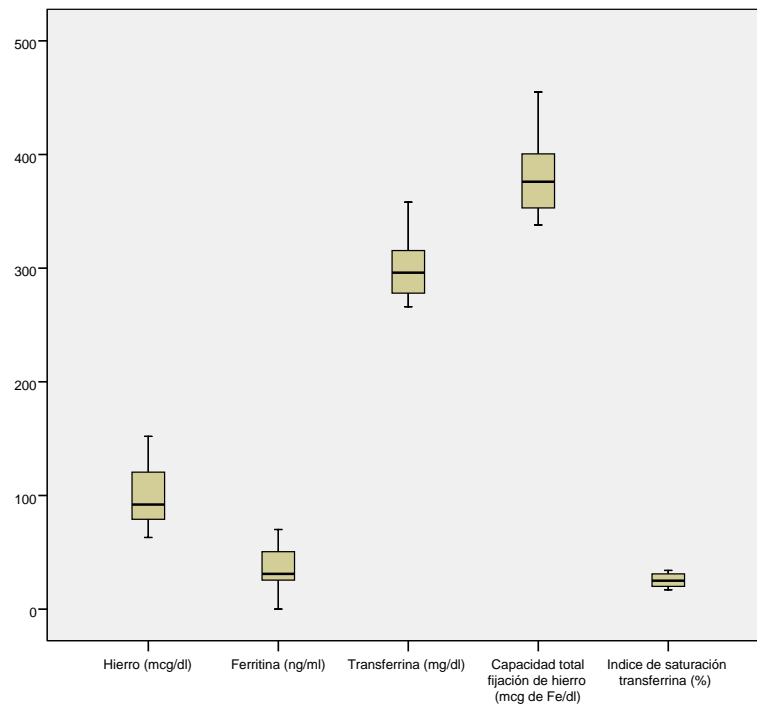
	RBC (10 <sup>6</sup> )	Hb (g/dl)	Hto (%)	Leucocitos (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	PMN (/mm <sup>3</sup> )	Linfocitos (/mm <sup>3</sup> )	Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )
Media (DS)	5.1 (0.36)	14.1 (1.02)	40.9 (2.86)	7.7 (3.3)	2.2 (0.87)	4.3 (2.7)	319 (91.3)
Intervalo confianza 95%, media	4.9-5.2	13.6- 14.5	39.5- 42.2	6.1-9.2	1.8-2.7	3-5.6	276-362
Error estándar media	0.08	0.22	0.64	0.74	0.19	0.62	20.4
Mediana (DS)	5.1	14	41	7	2.4	3.3	305
Varianza	1320	1.04	8.2	109.9	765.6	7836	8350
Valor mínimo	4.5	12	36	3.7	0.25	1.5	137
Valor máximo	5.7	16	46	15.9	3.5	1.1	548
Asimetría	-0.023	0.11	0.23	1.1	-0.86	1.5	0.61
Error estándar asimetría	0.51	0.5	0.51	0.51	0.51	0.51	0.51
Curtosis	-0.9	0.05	-0.45	0.97	0.40	1.9	1.2
Error estándar curtosis	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99	0.99
Amplitud intercuartil (IQC)	0.65	2	3	4.3	1.2	2.96	121
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,1 (0.2)	0,23 (0.00)	0,15 (0.2)	0,14 (0.2)	010 (0.2)	0.24 (0.00)	0.10 (0.2)
Percentiles 10 - 90	4.5-5.6	13-15.9	37-45.9	3.8-14.2	0.6-3.1	1.6-10.2	223-463

**Tabla 8.7.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables hematológicas: recuento de hematíes (RBC), hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), recuento leucocitos, polimorfonucleares (PMN), linfocitos y plaquetas en niñas.

	<b>RBC (10<sup>6</sup>)</b>	<b>Hb (g/dl)</b>	<b>Hto (%)</b>	<b>Leucocitos (10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>PMN (/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Linfocitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>
Media (DS)	5.03 (0.28)	14.5 (0.82)	42.2 (2)	6.9 (1.7)	2.6 (0.7)	3.3 (1.5)	288 (125)
Intervalo confianza 95%, media	4.8-5.2	13.9- 15.1	40.9- 43.6	5.7-8	2.1-3.1	2.2-4.4	204-372
Error estándar media	0.08	0.24	0.64	0.53	0.22	0.48	37.6
Mediana (DS)	5	15	43	6.6	2.4	3.04	293
Varianza	8050	0.67	4	3184	540.9	2543	1560
Valor mínimo	4.6	13	38	4	1.8	1.4	347
Valor máximo	5.5	16	45	10.8	4.1	7	519
Asimetría	0.15	-0.17	-0.91	0.69	0.94	1.3	-0.7
Error estándar asimetría	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66	0.66
Curtosis	-0.74	0.18	0.79	1.6	-0.02	2.1	3.1
Error estándar curtosis	1.27	1.27	1.27	1.27	1.27	11.27	1.27
Amplitud intercuartil (IQC)	0.5	1	3	4.3	1	1.8	105
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,13 (0.2)	0,25 (0.04)	0,18 (0.2)	0,18 (0.2)	0,17 (0.2)	0,14 (0.2)	0,26 (0.03)
Percentiles 10 - 90	4.6-5.4	13.2- 15.8	38.4- 44.8	4.2-10.3	1.8-4	1.5-6.6	184-489

**Tabla 8.8.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables hierro (sideremia), ferritina, transferrina, capacidad fijación de hierro, saturación de transferrina, capacidad antioxidante total del plasma en niños.

	<b>Hierro (mcg/dl)</b>	<b>Ferritina (ng/ml)</b>	<b>Trans- ferrina (mg/dl)</b>	<b>Fijación Fe (mcg de Fe/dl)</b>	<b>Sat. transfe- rrina (%)</b>	<b>Capacidad antioxidante total del plasma (1/IC50)</b>
Media (DS)	100.2 (34.6)	36.7 (20.1)	305.1 (27.4)	387.5 (34.9)	28.5 (8.2)	0.39 (0.94)
Intervalo confianza 95%, media	83.5- 116.9	23.23- 50.23	291-318	370-404	22.6-30.5	-0.05-0.85
Error estándar media	7.9	6.1	6.2	8	1.8	0.21
Mediana (DS)	96	31	302	384	26	0.13
Varianza	1198	403.8	753	1224	68.2	0.89
Valor mínimo	49	0	266	338	16	0.05
Valor máximo	184	70	358	455	48	4.15
Asimetría	0.73	0.09	0.6	0.61	0.84	3.9
Error estándar asimetría	0.52	0.66	0.52	0.5	0.5	0.52
Curtosis	0.34	-0.04	-0.57	-0.56	1	15.8
Error estándar curtosis	1.01	1.28	1.01	1	1	1.01
Amplitud intercuartil (IQC)	55	28	43	55	15	0.1
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,14 (0.2)	0,19 (0.2)	0,13 (0.2)	0,13 (0.2)	0,16 (0.16)	0,47 (0)
Percentiles 10 - 90	63-126	4.8-68.6	272-326	345-450	16-37	0.05-1.23

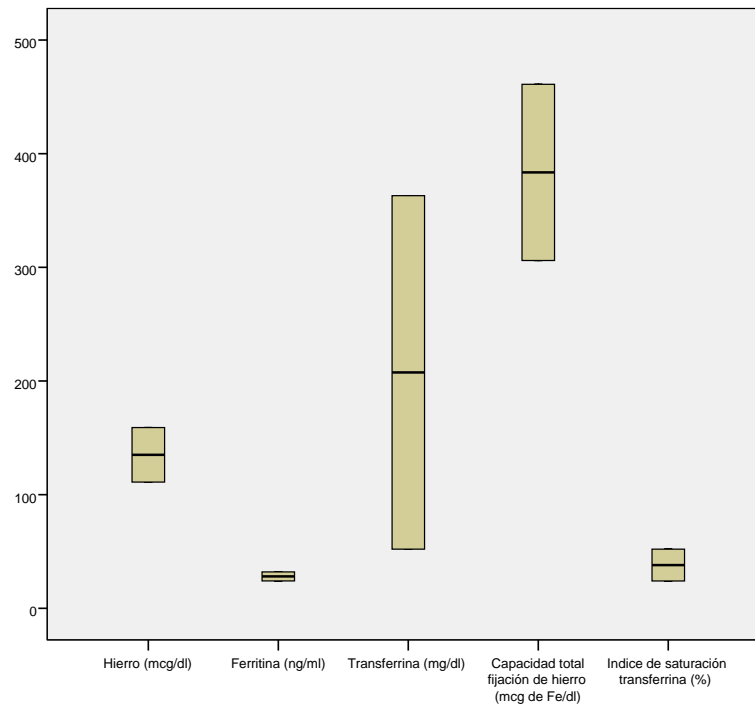


**Figura 8.1.** Boxplot de las variables hematológicas de hierro, ferritina, transferrina, capacidad de fijación de hierro e índice de saturación de transferrina en niños.

**Tabla 8.9.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables hierro (sideremia), ferritina, transferrina, capacidad fijación de hierro, saturación de transferrina, capacidad antioxidante total del plasma en niñas.

	Hierro (mcg/dl)	Ferritina (ng/ml)	Trans- ferrina (mg/dl)	Fijación Fe (mcg de Fe/dl)	Sat. transfe- rrina (%)	Capacidad antioxidante total del plasma (1/IC50)
Media (DS)	117.5 (35.5)	37.37 (16.61)	287.4 (91.3)	388.9 (57.2)	30.6 (10.8)	0.57 (0.52)
Intervalo confianza 95%, media	92-142.9	18.58- 56.56	222-352	347-429	22.8-38.3	0.19-0.94
Error estándar media	11.2	9.6	28.8	18.1	3.4	0.16
Mediana (DS)	116.5	32	288	365	26.5	0.41
Varianza	1261	276	8338	3282	116	0.27
Valor mínimo	73	24	52	306	18	0.03
Valor máximo	166	56	369	469	52	1.45
Asimetría	0.25	1.30	-2.13	0.24	1.03	0.56
Error estándar asimetría	11.2	1.22	0.68	0.68	0.68	0.68
Curtosis	-1.5	-	5.6	-1.5	0.31	-1.31
Error estándar curtosis	1.3	-	1.33	1.33	1.33	1.33
Amplitud intercuartil (IQC)	76	-	84	107	14	1
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0,17 (0.2)	0,30 NS	0,31 (0.004)	0,24 (0.09)	0,23 (0.14)	0.21 (0.2)
Percentiles 10 - 90	73.4-165	24-50	73.6-368	309-468	18.3-51.3	0.03-1.42



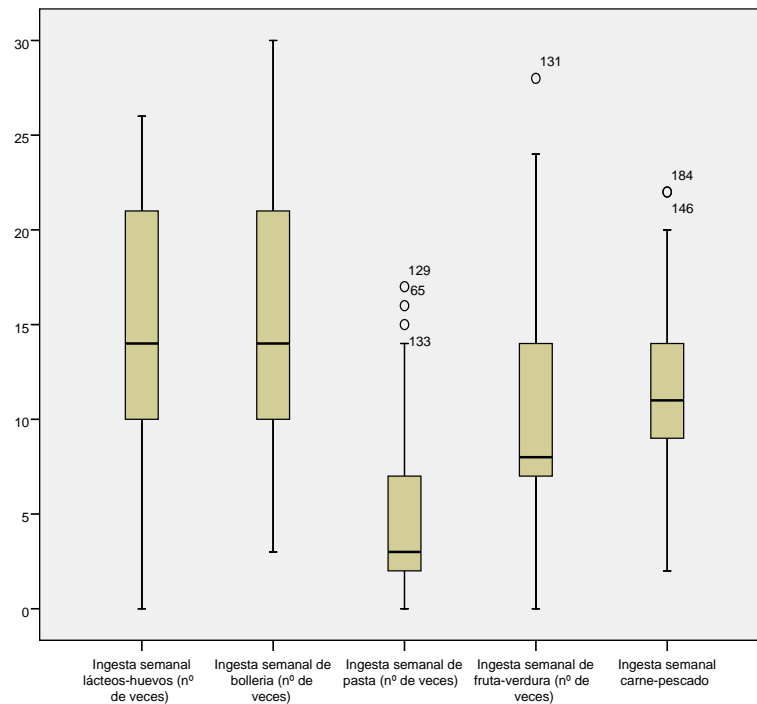


**Figura 8.2.** Boxplot de las variables hematológicas de hierro, ferritina, transferrina, capacidad de fijación de hierro e índice de saturación de transferrina en niñas.

**Tabla 8.10.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables nutricionales ingesta semanal de lacteos-huevos, bollería, carne-pescado, pasta y fruta-verdura en niños.

	Ingesta semanal lacteos- huevos	Ingesta semanal bollería	Ingesta semanal carne- pescado	Ingesta semanal pasta	Ingesta semanal fruta- verdura
Media (DS)	14.66 (5.67)	15.62 (6.81)	11.83 (4.15)	4.9 (4.3)	10.05 (6.28)
Intervalo confianza 95%, media	13,33- 15.98	14.03- 17.21	10.87-12.80	3.9-5.9	8.59-11.52
Error estándar media	0,66	0,80	0,48	0,50	0,73
Mediana (DS)	14	14	11	3	8
Varianza	32.23	46.40	17.20	18.50	39.39
Valor mínimo	0	3	2	0	0
Valor máximo	26	30	22	17	28
Asimetría	-0,03	0,2	0,62	1.29	0,81
Error estándar asimetría	0,28	0,28	0,29	0,28	0,28
Curtosis	-0,84	-0,73	0,11	0,73	0,15
Error estándar curtosis	0,55	0,55	0,55	0,55	0,55
Amplitud intercuartil (IQC)	11	12	5	5	8
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0,14 (0.001)	0,10 (0.06)	0,15 (0.000)	0,21 (0,000)	0,18 (0,000)
Percentiles 10 - 90	7-21	7-25.2	7-18.6	1-13	2-20

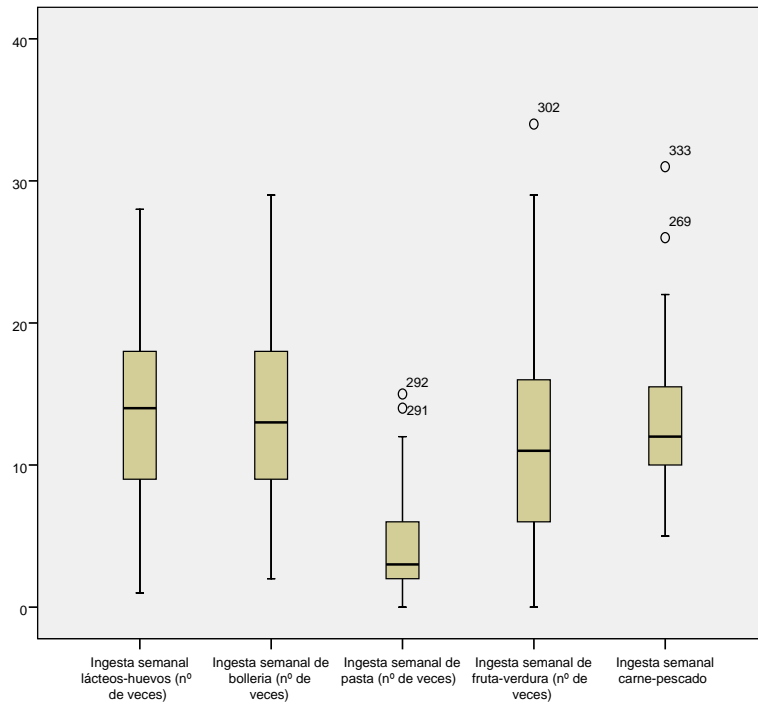
Las variables nutricionales son en su mayoría platicúrticas tanto en niños como en niñas, llama la atención que en número de ingestas semanales de pasta es inferior a la ingesta semanal de frutas y verduras.



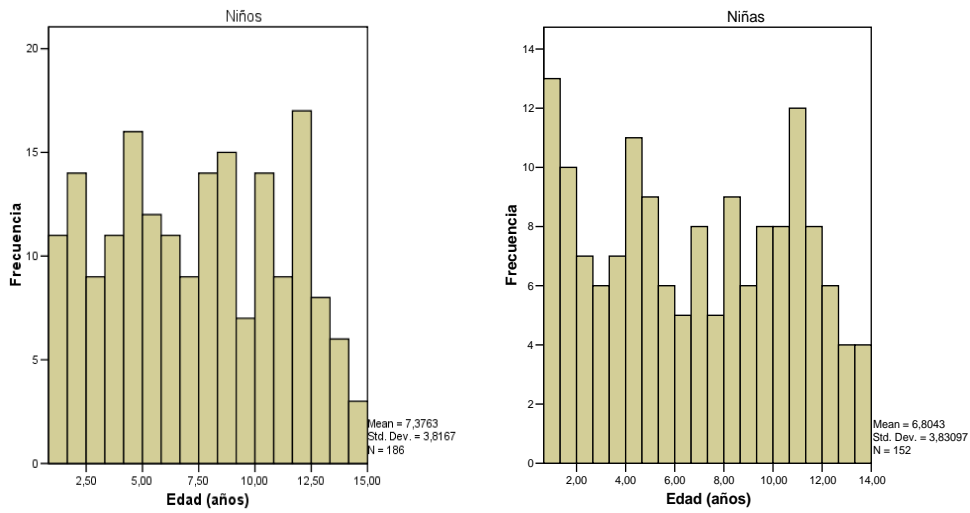
**Figura 8.3.** Boxplot de las variables nutricionales de ingesta de alimentos, se muestra la distribución del número de veces que se ingiere el alimento a la semana en niños.

**Tabla 8.11.** Descripción estadística de la cohorte de estudio para las variables nutricionales ingesta semanal de lácteos-huevos, bollería, carne-pescado, pasta y fruta-verdura en niñas.

	<b>Ingesta semanal lácteos-huevos</b>	<b>Ingesta semanal bollería</b>	<b>Ingesta semanal carne-pescado</b>	<b>Ingesta semanal pasta</b>	<b>Ingesta semanal fruta-verdura</b>
Media (DS)	14.22 (6.24)	13.90 (6.63)	13.16 (5.33)	4.25 (3.62)	11.55 (7.48)
Intervalo confianza 95%, media	12.46- 15.97	12.04- 15.77	11.66-14.65	3.24-5.27	9.45-13.65
Error estándar media	0,87	0,93	0,74	0,51	1.05
Mediana (DS)	14	13	12	3	11
Varianza	38.98	43.93	28,37	13.07	55.94
Valor mínimo	1	2	5	0	0
Valor máximo	28	29	31	15	34
Asimetría	0,29	0,62	1.13	1.38	0.89
Error estándar asimetría	0,33	0,33	0,33	0,33	0,33
Curtosis	-0,59	-0,42	1.63	1.25	0,63
Error estándar curtosis	0,65	0,65	0,65	0,66	0,66
Amplitud intercuartil (IQC)	9	9	6	5	11
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0,10 (0,20)	0,16 (0,002)	0,14 (0,011)	0,26 (0,000)	0,14 (0,011)
Percentiles 10 - 90	7-22.8	7-24.6	8-21.8	1-10.6	4-23



**Figura 8.4.** Boxplot de las variables nutricionales de ingesta de alimentos, se muestra la distribución del número de veces que se ingiere el alimento a la semana en niñas.



**Figura 8.5.** Histograma con la distribución de las edades de los niños incluidos en la cohorte de estudio.

## 8.2. Inferencia estadística.

La Inferencia Estadística es aquella rama de la estadística mediante la cual se trata de sacar conclusiones de una población en estudio, a partir de la información que proporciona una muestra representativa de la misma. También es denominada estadística inductiva o inferencia inductiva ya que es un procedimiento para generar nuevo conocimiento científico.

### 8.2.1. Análisis de la prevalencia de portadores por localidad.

**Tabla 8.12.** Prevalencia de portadores de *N. meningitidis* por municipios.

		Portador meningococo		Población	
		Negativo	Positivo	En estudio	Total
<b>Municipio</b>	Aldeire	21	0	21 (22.58 %)	93
	Alquife	61	4	65 (59.09 %)	110
	Dólar	21	1	22 (37.93%)	58
	Ferreira	4	0	4 (12.12%)	33
	Hueneja	56	4	60 (40.81%)	147
	Jérez	61	5	66 (56.41%)	117
	La Calahorra	36	2	38 (45.23%)	84
	Lanteira	44	4	48 (77.41%)	62
<b>Total</b>		304	20	324 (46.02%)	704

La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* en la población estudiada fue de 6.5%, siendo sustancialmente mayor en los sujetos de menos de 4 años, con un repunte de prevalencia por encima de los 8 años. De ellos el 58.8% fueron niños y el 41.2% niñas; sin que existan diferencias estadísticas entre sexos en la distribución por edad. El 70% de los portadores de *N. meningitidis* y el 73% de los controles no consumieron antibióticos en los últimos 2 meses, sin diferencias estadísticas entre portadores y controles por estratos de edad.

La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* por municipios se refleja en la Tabla 8.12. Solicitan ser incluidos en el estudio el 46% de la población de la Zona Básica de Salud, en concreto integran el estudio 324 niños de la Zona Básica del Marquesado de los 704 niños que supone el censo total infantil de la población. Por municipios la participación oscila entre 12% correspondiente al municipio de Ferreira y el 77% correspondiente al municipio de Lanteira.

En total se aislaron 20 portadores de *N.meningitidis* de los cuales el mayor número de aislamientos se produjo en Jerez con 5 casos. En la tabla siguiente se presentan los distintos serogrupos de *N. meningitidis* y observamos 15 aislamientos de *N. meningitidis* no aglutinables, 5 *N. meningitidis* grupo B y ninguna *N. meningitidis* del grupo C.

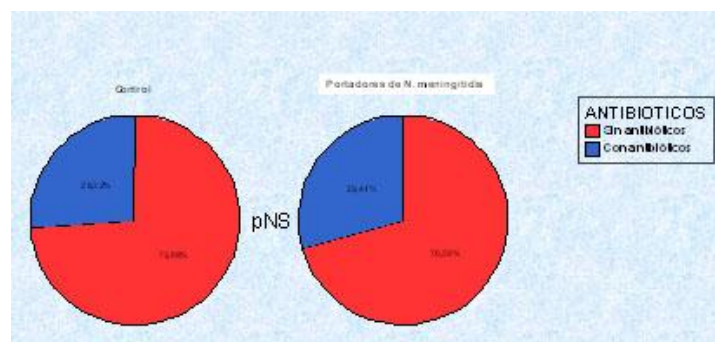
**Tabla 8.13.** Identificación de serogrupos de *N. meningitidis*.

Id	Iniciales del paciente	Municipio	Edad (años cumplidos)	Serogrupo <i>N. meningitidis</i> aislado
1	SBR	JEREZ	10	No aglutinable
2	JRM	ALQUIFE	9	No aglutinable
3	TSH	JEREZ	9	No aglutinable
4	EGG	JEREZ	8	B
5	RHR	JEREZ	3	No aglutinable
6	ATC	ALQUIFE	2	No aglutinable
7	MMF	JEREZ	2	B
8	PS	DÓLAR	1	No aglutinable
9	MHG	LANTEIRA	6	No aglutinable
10	JARE	HUENEJA	6	No aglutinable
11	FSG	ALQUIFE	4	B
12	JAD	ALQUIFE	3	No aglutinable
13	YGR	LANTEIRA	12	No aglutinable
14	CGP	LANTEIRA	8	No aglutinable
15	OCH	LA CALAHORRA	2	B
16	MCGJ	HUENEJA	2	No aglutinable
17	ING	LANTEIRA	13	No aglutinable
18	BHT	LA CALAHORRA	11	B
19	AMP	HUENEJA	11	No aglutinable
20	MLMS	HUENEJA	1	No aglutinable
Total				20

### 8.2.2. Estudio de portadores y consumo de antibióticos en la cohorte de estudio.

Se analizó el número de pacientes que consumieron algún antibiótico en los 2 meses previos a la inclusión en el estudio. Observamos que 83 pacientes (24.5%) habían consumido algún antibiótico en este periodo, de ellos tan sólo 6 fueron portadores de *N. meningitidis*, lo que suponen el 30% del total de portadores. El test de  $\chi^2$  para esta asociación fue  $\chi^2 = 0.35$ ; pNS.

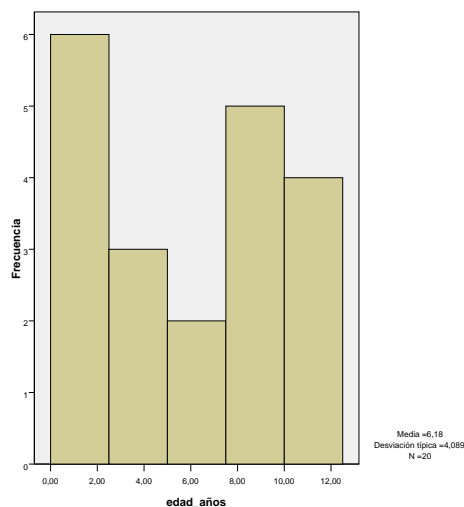
No observamos asociación en la muestra entre el consumo de antibióticos en los 2 meses previos al estudio y estado de portador de *N. meningitidis* (OR 1.35, IC 95%: 0,50 a 3,63).



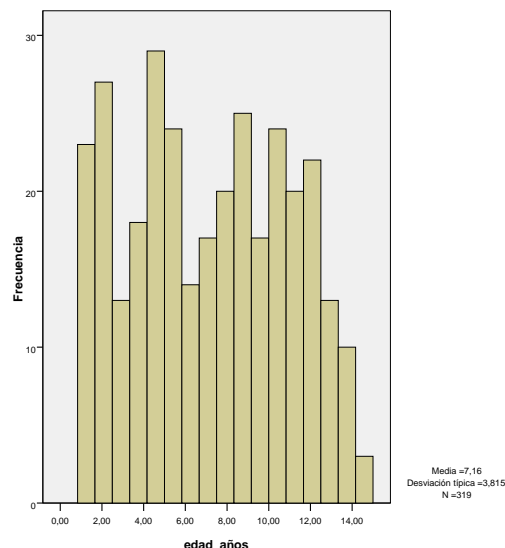
**Figura 8.6.** Porcentaje de consumo de antibióticos entre sujetos portadores de *N. meningitidis* y controles.

### 8.2.3. Análisis de la distribución de portadores por grupos de edad.

La distribución por edades de los sujetos portadores de *N. meningitidis*, representada en los histogramas de la siguiente figura muestra clara diferencias entre sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*. Es especialmente llamativo que durante el intervalo de edad de 4 a 7 años la prevalencia de portadores disminuye a pesar de que existe una población suficiente en nuestra población para ese intervalo de edad. La distribución de frecuencias de este histograma nos permite observar que los sujetos portadores de *N. meningitidis* de nuestra muestra tienen 2 picos de máxima frecuencia con una depresión de frecuencia entre los 4 y los 7 años de edad. Esta circunstancia servirá de base argumental para categorizar la muestra para análisis posteriores en tres etapas: 1 a 3 años, 4 a 7 años y de 7 años en adelante.



**Figura 8.7.** Histograma de la distribución por edades de los sujetos portadores de *N. meningitidis*.



**Figura 8.8.** Histograma de la distribución por edades de los sujetos no portadores de *N. meningitidis*.

Una cohorte de 339 niños fueron reclutados, la edad media de los niños seleccionados como controles fue de 7,1 (IC 95% 6,7 a 7,6) y de 6,2 (IC 95%: 4,3 a 8,1)

en los casos. No se observaron diferencias significativas entre los grupos ( $t = 1,11$ ; PNS). La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* en la población estudiada fue de 6.5 % (IC 95% 3,64 a 8,96). Se observa que en la muestra menor de 3 años, el 10.3% es portador de *N. meningitidis*. En el estrato de 3 a 7 años el 3.9% es portador de *N. meningitidis* y en los niños mayores de 7 años el 5.3% es portador. Hemos calculado el riesgo de ser portador de *N. meningitidis* por estrato de edad y observamos que en los menores de 3 años el riesgo de portador es del 11.5% (IC 95%: 4.7 a 22.2); en los niños entre 3 y 7 años es del 4.1% (IC 95%: 1.1 a 10.1) y en los mayores de 7 años es del 5.6% (IC 95%: 2.6 a 10.4). En nuestra muestra no se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de edad en la prevalencia del estado de portador de *N. meningitidis*.

**Tabla 8.14.** Portadores de *N. meningitidis* por estratos de edad.

			Edad (años)			Total
			< 3 años	3-7 años	> 7 años	
Portador meningococo	Negativo	Recuento	61	98	160	319
		% de Edad (años)	89,7%	96,1%	94,7%	94,1%
	Positivo	Recuento	7	4	9	20
		% de Edad (años)	11,5%	4,1%	5,6%	6,5 %
Total			68	102	169	339

#### 8.2.4. Análisis de la influencia del IMC sobre el estado de portador para cada grupo de edad.

Atendiendo al valor del índice de masa corporal pudimos clasificar nuestra población de estudio en 3 categorías: peso normal, sobrepeso y obesos (164). La distribución de portadores de *N. meningitidis* entre estas categorías se muestra en la Tabla 8.15.

Se estudia una muestra poblacional de 324 niños con edades de 1 a 14 años y una edad media de 7.1 años (DS: 3.8). El 55% de los participantes eran niños y el 45% niñas. Del total de la muestra, 32 (9.8%) eran obesos y 35 (10.9%) tenían sobrepeso según los criterios de Cole y cols (164) sin diferencias estadísticamente significativas entre niños y niñas, aunque observándose un aumento lineal del porcentaje de obesidad con la edad. Analizando el estado de portador de *N. meningitidis* obtenemos 20 portadores de los que 12 son niños y 8 niñas; el riesgo de ser portador ligado al sexo es de 0.81 (IC 95%: 0.32-2.02).

Valoramos la influencia del índice de masa corporal (IMC) en los 3 estratos de edad definidos anteriormente y en las categorías de IMC normal, con sobrepeso y obesos, según los puntos de corte definidos por TJ Cole y cols. (164). Tomamos como categoría de referencia los sujetos sin sobrepeso y realizamos un análisis de tendencias estratificado por edad, cuyos resultados se reproducen en la Tabla 8.15. Se observa una tendencia estadísticamente significativa a aumentar el riesgo de portador de *N. meningitidis* con el aumento del IMC ( $z=2.03$ ;  $p=0.04$ ), tras el ajuste por edad con la

ponderación de Mantel-Haenszel esta relación aumenta ( $z=2.38$ ;  $p=0.01$ ). De la valoración del riesgo se puede deducir que el riesgo de ser portador de *N. meningitidis* de los niños obesos es tres veces mayor que en los niños sin sobrepeso (IC 95%: 1.3-9.9).

**Tabla 8.15.** Análisis del riesgo de portadores de *N. meningitidis* estratificado por edad e IMC en sus tres categorías de normal, sobrepeso y obesos; se toma como categoría de referencia el IMC normal.

Edad	IMC			TOTAL
	Normal	Sobrepeso	Obeso	
<b>&lt; 3 años</b>				
Portadores	6	0	1	7
No portadores	47	6	1	54
Test para tendencia $z=0.75$ ; $p=0.45$				
<b>3-7 años</b>				
Portadores	0	0	4	4
No portadores	82	3	9	94
Test para tendencia $z=5.03$ ; $p=0.0001$				
<b>&gt;7 años</b>				
Portadores	6	3	0	9
No portadores	103	26	22	151
Test para tendencia $z=0.52$ ; $p=0.60$				
<b>Todas las edades</b>				
Portadores	12	3	5	20
No portadores	232	35	32	299
Riesgo crudo	-	1.6 (0.5-5.4)	2.75 (1.0-7.4)	
Test para tendencia $z=2.03$ ; $p=0.04$				
Riesgo ajustado	-	1.3 (0.4-4.6)	3.6 (1.3-9.9)	
Mantel-Haenszel				
Test para tendencia corregido $z=2.38$ ; $p=0.01$				

## 8.2.5. Test de comparación de un conjunto de muestras relacionadas.

A priori el conjunto de variables incluidas en esta memoria de tesis doctoral podrían considerarse típicas variables biológicas con un tamaño muestral grande, por lo que adoptamos test estadísticos paramétricos.

### 8.2.5.1. Análisis de las variables somatométricas en sujetos portadores y no portadores.

La siguiente Tabla compara las variables somatométricas incluidas en este proyecto considerando como variable de agrupación el estado o no de portador de *N. meningitidis*. Se analizan en la siguiente tabla las comparaciones para las variables peso, talla, índice de masa corporal, pliegues subescapular, bicipital, suprailiaco y tricípital, área muscular del brazo (AMB), área grasa del brazo (AGB), índice adiposo muscular (IAM), densidad corporal (DC), grasa corporal total (GCT), cociente IMC/ capacidad antioxidante total del plasma y cociente GCT/ capacidad antioxidante total del plasma.



En la tabla 8.16 no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre portadores de *N. meningitidis* y controles en las distintas variables somatométricas estudiadas.

**Tabla 8.16.** Test de comparación de medias de portadores de *N. meningitidis* y controles entre variables somatométricas.

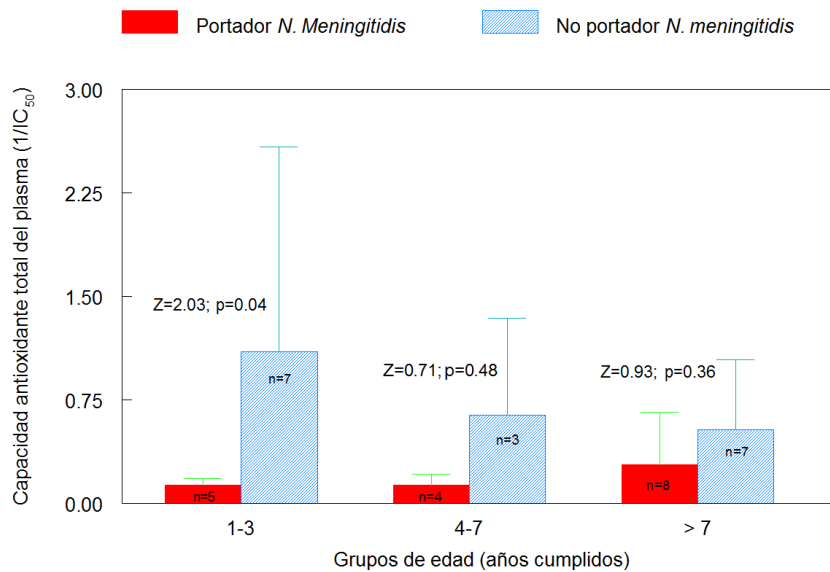
	Diferencia de Medias (ES)	IC 95% de la diferencia	t (p)
Peso	-1.20 ( 5.78)	-12.94 – 10.57	0.21 (pNS)
Talla	-1.84 ( 8.83)	-19.80 – 16.11	0.21 (pNS)
Pliegue tricpital	-1.11 (1.2)	-5.08 – 2.85	0.57 (pNS)
Pliegue bicipital	-0.54 (0.89)	-2.34 – 1.27	0.60 (pNS)
Pliegue subescapular	-0.17 (1.9)	-4.02 – 3.68	0.09 (pNS)
Pliegue suprailiaco	-3.42(4.4)	-12.36 – 5.52	0.78 (pNS)
Perímetro braquial	-0.61 (1.26)	-3.17 – 1.95	0.48 (pNS)
Índice de masa corporal (IMC)	-0.94 (1.26)	-3.5 – 1.62	0.75 (pNS)
Area grasa del brazo	119.88 (193.12)	-272.58 – 512.34	0.62 (pNS)
Área muscular del brazo	-131.53 (224.37)	-587.51 – 324.44	0.59 (pNS)
Índice adiposo muscular	7.14 (5.99)	-5.03 – 19.31	0.24 (pNS)
Densidad corporal total	0.01 (0.01)	-0.01 – 0.01	1.01 (pNS)
Grasa corporal total (GCT)	-0.62 (2.22)	-5.13 – 3.88	0.28 (pNS)
Cociente IMC/Aox plasma	-95.70 (52.02)	-201.67 – 10.27	1.84 (pNS)
Cociente GCT/Aox plasma	-68.78 (41.76)	-147.86 – 22.29	1.50 (pNS)

#### 8.2.5.2. Análisis de la capacidad antioxidante total del plasma en sujetos portadores y no portadores distribuidos por grupos de edad.

La capacidad antioxidante total del plasma en niños de 1 a 3 años fue de 0.13 (IC 95% 0.07 a 0.19) para los niños portadores de *N. meningitidis*, y 1.10 (IC 95% -0.27 – 2.46) en los controles. En los niños de 4 a 7 años este valor fue de 0.13 (IC 95% 0.05 a 0.20) en los portadores de *N. meningitidis* y 0.64 (IC 95% -0.16 a 1.44) en los controles. En el grupo de mayor edad el valor medio de la capacidad antioxidante total del plasma fue de 0.27 (IC 95% 0.02 a 0.52) en los sujetos portadores de *N. meningitidis* y 0.52 (IC 95% 0.14 a 0.89) en los sujetos no portadores.

En la comparación entre sujetos portadores y no portadores se observan diferencias significativas en la capacidad antioxidante total del plasma entre los grupos de 1 a 3 años ( $z = 2.03$ ,  $p = 0,04$ ). En el grupo de 4 a 7 años y en los mayores de 7 años no observamos diferencias significativas entre grupos ( $z = 0.71$ ,  $p = 0.48$ ) y ( $z = 0.93$ ,  $p = 0.36$ ) respectivamente.

De acuerdo a los artículos publicados por otros autores (163), la capacidad antioxidante total del plasma humano normal (expresado como el recíproco de la IC50) resultó en  $0,37 \pm 0,06$ . Hemos analizado la asociación entre la capacidad antioxidante total del plasma (por debajo de  $0,37 - 2$  DS) y el estado de portador de *N. meningitidis*. En el estado de portador, la odds ratio para esta asociación (capacidad antioxidante total del plasma por debajo de 0,25) fue  $OR=8,44$  (IC 95%: 1,5 - 48,9). La fracción atribuible poblacional es de 77,8% (IC 95%: 47,2 a 108,4).



**Figura 8.9.** Análisis comparativo del nivel de antioxidantes plasmáticos por grupos de edad entre sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*.

### 8.2.5.3. Análisis de la capacidad antioxidante total del plasma en sujetos portadores y no portadores distribuidos por género.

Se desea analizar la relación entre el nivel bajo de antioxidantes en plasma y el riesgo de portador asintomático de *N. meningitidis*. Se define el nivel bajo de capacidad antioxidante total del plasma como la media – DS.

**Tabla 8.17.** Distribución de portadores de *N. meningitidis* por género y nivel de antioxidantes.

Sexo	Nivel Antioxidante	Portadores	No Portadores	Total
Femenino	Normal-Alto	2	6	8
	Bajo	4	1	5
Masculino	Normal-Alto	0	3	3
	Bajo	11	7	18
Total	Normal-Alto	2	9	11
	Bajo	15	8	23

De forma global se comprueba que los pacientes con niveles bajos de antioxidantes tienen un RR=3.58 (15/23 : 2/11) de ser portadores de *N. meningitidis*. El RR de ser portador en niñas es de 3.8 (4/5 : 2/8), mayor que el observado en niños. En algunos de estos pacientes no fue posible medir la capacidad antioxidante total del plasma, se selecciono en todos los casos el control siguiente de la misma edad y sexo como control.

### 8.2.5.4. Análisis comparativo de las variables nutricionales entre sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*.

Las variables nutricionales se registraron como número de ingesta de cada grupo nutricional a la semana, por tanto al ser resultado de un recuento se consideró la realización de test no paramétricos en este estudio de comparación. Como se aprecia no se evidenciaron diferencias significativas entre los niños portadores y no portadores de *N. meningitidis* para cada variable.

**Tabla 8.18.** Test de comparación de medias de portadores de *N. meningitidis* y controles entre variables nutricionales.

	Rango promedio		Suma de rangos	z (p)
	Caso/	Control		
Ingesta de bollería/pan	13,57/14,54		203,5/ 174,5	0,32 (pNS)
Ingesta de carne/pescado	14.93/12.83		224/154	0.69 (pNS)
Ingesta de pasta	14.90/12.88		223.5/154.5	0.66 (pNS)
Ingesta de fruta/verdura	14.80/13		222/156	0.59 (pNS)
Ingesta de huevos/lacteos	13.97/14.04		209.5/168.5	0.02 (pNS)

#### 8.2.5.5. Análisis comparativo de las variables hematológicas entre sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*.

La Tabla siguiente muestra los resultados de la comparación de las variables hematológicas, perfil férrico y capacidad antioxidante total del plasma entre los niños portadores de meningococo y los controles. Considerados niños y niñas de forma conjunta observamos valores medios de capacidad antioxidante total del plasma significativamente menores en sujetos portadores de *N. meningitidis*; al considerar los sexos por separado, esta diferencia no se observa ( $t=1,57$ ; pNS en niños y  $t=1.72$ ; pNS en niñas), esta circunstancia obedece muy probablemente a razones de tamaño de muestra, ya que la capacidad antioxidante total del plasma no difiere significativamente entre sexos.

**Tabla 8.19.** Test de comparación de medias de niños portadores de *N. meningitidis* y controles entre variables hematológicas.

	Diferencia de Medias (ES)	IC 95% de la diferencia	t (p)
Nº de hematíes / mL	-117500 (120157)	-363249 - 128249	0.98 (pNS)
Nº de leucocitos / mL	519 (1041)	-1611 - 2650	0.49 (pNS)
Nº de plaquetas / mL	-33380 (37333)	-109736 - 42976	0.89 (pNS)
Nº de polimorfonucleares / mL	434 (295)	-169 - 1037	1.47 (pNS)
Linfocitos / mL	269 (896)	-1564 - 2103	0,30 (pNS)
Hierro (mcg/dL)	0.87(12.90)	-25.5 - 27.3	0.07 (pNS)
Ferritina (ng/mL)	-19.62 (35.03)	-96.7 - 57.4	0.56 (pNS)
Transferrina (mg/dL)	12.15 (21.41)	-31.7 - 56.0	0.56 (pNS)
C.Total de Fijación de hierro (mcg de Fe / dL)	-0.55 (16.24)	-33.8 - 32.7	0.03(pNS)
I. saturación de transferrina (%)	0.34 (3.49)	-6.8 - 7.51	0.1 (pNS)
Hemoglobina ( g/dl)	0.15 (0.35)	-0.5 - 0.8	0.41 (pNS)
Hematocrito (%)	-0.23 (0.96)	-2.2 - 1.7	0.24 (pNS)
C. antioxidante plasma (1/IC50)	0.59 (0.25)	0.04 - 1.12	<b>2.26 (p=0.03)</b>

### 8.2.6. Análisis de correlación entre capacidad antioxidante total del plasma y el resto de variables.

Como puede apreciarse en la siguiente Tabla observamos coeficientes de correlación débilmente significativos entre la capacidad antioxidante plasmática y su cociente con el índice de masa muscular en no portadores, este hallazgo parece clínicamente irrelevante y tiene una significación difícil de definir.

**Tabla 8.20.** Análisis de correlación de Pearson entre capacidad antioxidante total del plasma y el resto de variables estudiadas en sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*.

	Portadores	No portadores
	r (p)	r (p)
Peso	0.47 (pNS)	0.04 (pNS)
Talla	0.38 (pNS)	0.05 (pNS)
Pliegue tricipital	0.38 (pNS)	0.13 (pNS)
Pliegue bicipital	0.29 (pNS)	0.16 (pNS)
Pliegue subescapular	0.06(pNS)	0.11 (pNS)
Pliegue suprailíaco	0.03(pNS)	0.14 (pNS)
Perímetro braquial	0.30 (pNS)	0.02 (pNS)
Area grasa del brazo	0.40 (pNS)	0.01 (pNS)
Índice adiposo muscular	0.13 (pNS)	0.07 (pNS)
Area muscular del brazo	0.40 (pNS)	0.01 (pNS)
Índice de masa muscular	0.34 (pNS)	0.10 (pNS)
Densidad corporal	0.26 (pNS)	0.06 (pNS)
Grasa corporal total	0.41(pNS)	0.07 (pNS)
Rat. GCT / Aox	0.24 (pNS)	0.43 (pNS)
Rat. IMC / Aox	0.42(pNS)	<b>0.53( p &lt;0.03)</b>
Nº de hematíes / mL	0.06 (pNS)	0.43 (pNS)
Hemoglobina	0.03 (pNS)	0.20 (pNS)
Hematocrito	0.05 (pNS)	0.11 (pNS)
Nº de leucocitos / mL	0.02 (pNS)	0.41 (pNS)
Nº de plaquetas / mL	0.05 (pNS)	0.38 (pNS)
Nº de polimorfonucleares / mL	0.09 (pNS)	0.03 (pNS)
Linfocitos / mL	0.05 (pNS)	0.47 (pNS)
Hierro (mcg/dL)	0.07 (pNS)	0.14 (pNS)
Ferritina (ng/mL)	0.01 (pNS)	0.26 (pNS)
Transferrina (mg/dL)	0.30 (pNS)	0.41 (pNS)
Capacidad Total de Fijación de hierro (mcg de Fe / dL)	0.40 (pNS)	0.42 (pNS)
Índice de saturación de transferrina	0.07 (pNS)	0.10 (pNS)
Ingesta semanal lácteos-huevos	0.16 (pNS)	0.42 (pNS)
Ingesta semanal de bollería	0.23 (pNS)	0.37 (pNS)
Ingesta semanal de pasta	0.35 (pNS)	0.46 (pNS)
Ingesta semanal de fruta- verdura	0.09 (pNS)	0.26 (pNS)
Ingesta semanal de pescado - carne	0.12 (pNS)	0.16 (pNS)

El estudio de correlación no muestra coeficientes de correlación significativos entre la capacidad antioxidante total del plasma y las restantes variables evaluadas; tan

sólo en los pacientes no portadores observamos una correlación débil con el cociente entre índice de masa corporal y antioxidantes plasmáticos.

### 8.2.7.1. Análisis de regresión de la capacidad antioxidante total del plasma y las variables somatométricas en sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*.

Realizamos un análisis categorizado por grupos de edad, según los grupos definidos con anterioridad. Por exigencias del tamaño muestral analizamos en su conjunto niños y niñas. En el estrato de mayor edad encontramos asociación positiva en sujetos no portadores entre las variables somatométricas y capacidad antioxidante total del plasma; esta asociación se pierde cuando consideramos sujetos portadores.

Analizamos en primer lugar el estrato de edad de 1 a 3 años, en él no observamos rectas de regresión con significación estadística entre variables somatométricas y capacidad antioxidante total del plasma, ello tanto en sujetos portadores como no portadores de *N. meningitidis*. Por tanto, parece que otros factores además de los considerados podrían estar implicados en la mayor prevalencia de portadores de *N. meningitidis* en este periodo.

Por circunstancias relacionadas con el tamaño muestral, prescindimos del estudio de regresión en el grupo etario de 3 a 7 años para muchas de las variables analizadas. En el estrato de más de 7 años, observamos rectas de regresión significativas entre capacidad antioxidante total del plasma y algunas de las variables somatométricas consideradas en sujetos no portadores de *N. meningitidis*. Sin embargo, esta asociación no existe en los sujetos portadores.

**Tabla 8.21.** Análisis de regresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables somatométricas en el estrato de edad de 1 a 3 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Índice masa corporal	0.15	-8.37	0.59	0.62	0.94	0.38	NS
Área muscular del brazo	0.15	1.77	-0.005	0.006	0.94	0.38	NS
Area grasa del brazo	0.18	0.78	0.006	0.006	1.07	0.33	NS
Índice adiposo-muscular	0.000	1.08	0.001	0.02	0.02	0.98	NS
Densidad corporal total	0.027	45.32	-41.7	112.8	0.37	0.72	NS
Grasa corporal total	0.06	1.47	-0.05	0.09	0.58	0.58	NS
Peso	0.14	-1.79	0.23	0.25	0.91	0.40	NS
Talla	0.12	-5.76	0.07	0.09	0.82	0.44	NS
Pliegue tricipital	0.33	3.68	-0.32	0.20	1.59	0.17	NS
Pliegue bicipital	0.09	-0.83	0.36	0.50	0.73	0.49	NS
Pliegue subescapular	0.03	0.02	0.16	0.36	0.44	0.67	NS
Pliegue suprailíaco	0.16	-0.20	0.24	0.24	0.99	0.36	NS

Analizando la Tabla se evidencia que no existen rectas de regresión con significación estadística entre la capacidad antioxidante total del plasma y las distintas variables somatométricas analizadas en el grupo de 1 a 3 años tanto para los portadores de *N. meningitidis* ( tabla 8.21) como para los controles ( tabla 8.22).

**Tabla 8.22.** Análisis de regresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante del plasma (variable dependiente) y variables somatométricas en el estrato de edad de 1 a 3 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Índice masa corporal	0.18	0.42	-0.01	0.02	0.82	0.47	NS
Área muscular del brazo	0.27	0.08	0.000	0.000	1.06	0.36	NS
Área grasa del brazo	0.16	0.13	0.000	0.000	0.08	0.49	NS
Índice adiposo-muscular	0.11	0.13	-0.003	0.004	0.63	0.56	NS
Densidad corporal total	0.18	3.55	-3.24	3.97	0.81	0.47	NS
Grasa corporal total	0.21	0.15	-0.007	0.007	0.91	0.42	NS
Peso	0.23	0.24	-0.009	0.01	0.94	0.41	NS
Talla	0.22	0.47	-0.004	0.004	0.03	0.42	NS
Pliegue tricípital	0.18	0.03	0.009	0.01	0.83	0.46	NS
Pliegue bicipital	0.11	0.28	-0.03	0.04	0.61	0.58	NS
Pliegue subescapular	0.000	0.13	0.000	0.01	0.02	0.98	NS
Pliegue supriliaco	0.27	0.03	0.01	0.01	1.06	0.36	NS

En la tabla 8.23 encontramos asociación negativa entre el pliegue subescapular y la capacidad antioxidante total del plasma en sujetos no portadores en el estrato de edad de 4 a 7 años. Existe asociación entre la disminución del pliegue subescapular y el aumento de la capacidad antioxidante total del plasma en niños no portadores en este estrato de edad. Para el resto de variables analizadas no encontramos significación estadística.

**Tabla 8.23.** Análisis de regresión de regresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables somatométricas en el estrato de edad de 4 a 7 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Índice masa corporal	0.84	5.26	-0.25	0.10	2.30	0.26	NS
Área muscular del brazo	0.35	1.21	-0.01	0.002	0.73	0.59	NS
Área grasa del brazo	0.32	0.91	0.002	0.002	0.70	0.61	NS
Índice adiposo-muscular	0.91	0.25	2.98	0.91	3.27	0.18	NS
Densidad corporal total	0.79	-40.24	39.18	19.98	1.96	0.30	NS
Grasa corporal total	0.19	-1.31	0.32	0.66	0.48	0.71	NS
Peso	0.01	1.09	-0.18	0.14	0.12	0.92	NS
Talla	0.43	-4.86	0.04	0.05	0.87	0.54	NS
Pliegue tricípital	0.46	2.32	-0.12	0.12	0.93	0.52	NS
Pliegue bicipital	0.14	1.24	-0.08	0.20	0.40	0.75	NS
Pliegue subescapular	1.00	2.79	-0.19	0.003	66.1	0.01	**
Pliegue supriliaco	0.76	2.11	-0.13	0.07	1.79	0.32	NS

En la tabla 8.24 analizamos la regresión entre capacidad antioxidante total del plasma y variables somatométricas en el estrato de edad de 4 a 7 años en portadores de *N. meningitidis*. Hay asociación negativa entre el peso y la capacidad antioxidante total del plasma. La disminución del peso en estos niños se asocia a un aumento de la capacidad antioxidante total del plasma. Para el resto de variables analizadas no encontramos ninguna significación estadística.

**Tabla 8.24.** Análisis de regresión de regresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables somatométricas en el estrato de edad de 4 a 7 años cumplidos.

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>	<b>Nivel</b>
Índice masa corporal	0.06	0.23	-0.005	0.01	0.44	0.68	NS
Área muscular del brazo	0.67	0.20	0.000	0.000	2.47	0.09	NS
Area grasa del brazo	0.28	0.11	0.000	0.000	1.08	0.35	NS
Índice adiposo-muscular	0.24	0.11	0.01	0.01	0.99	0.39	NS
Densidad corporal total	0.22	-2.01	2.05	2.18	0.94	0.41	NS
Grasa corporal total	0.39	0.17	-0.008	0.006	1.40	0.25	NS
Peso	0.93	0.49	-0.01	0.002	6.40	0.008	***
Talla	0.35	0.52	-0.003	0.003	1.27	0.29	NS
Pliegue tricípital	0.56	0.29	-0.01	0.006	1.95	0.14	NS
Pliegue bicipital	0.10	0.20	-0.009	0.01	0.60	0.59	NS
Pliegue subescapular	0.18	0.19	-0.006	0.007	0.82	0.46	NS
Pliegue suprailíaco	0.06	0.16	-0.003	0.006	0.44	0.68	NS

**Tabla 8.25.** Análisis de regresión de regresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables somatométricas en el estrato de edad de más de 7 años cumplidos.

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>	<b>Nivel</b>
Índice masa corporal	0.48	-0.5	0.05	0.02	2.17	0.08	NS
Área muscular del brazo	0.51	0.24	0.000	0.000	2.29	0.07	NS
Area grasa del brazo	0.41	0.39	-0.001	0.000	-1.89	0.11	NS
Índice adiposo-muscular	0.15	0.60	-0.006	0.007	0.94	0.38	NS
Densidad corporal total	0.86	27.02	-25.24	4.52	5.58	0.003	***
Grasa corporal total	0.000	0.51	0.002	0.06	0.03	0.97	NS
Peso	0.58	-0.08	0.016	0.006	2.67	0.04	*
Talla	0.81	-3.19	0.02	0.006	4.63	0.006	**
Pliegue tricípital	0.68	-0.28	0.06	0.02	3.28	0.02	*
Pliegue bicipital	0.79	-0.34	0.12	0.02	4.38	0.007	**
Pliegue subescapular	0.59	0.10	0.03	0.01	2.72	0.04	*
Pliegue suprailíaco	0.56	0.2	0.02	0.01	2.54	0.05	NS

En la tabla 8.25 encontramos asociación negativa entre densidad corporal total y capacidad antioxidante total del plasma y asociación positiva entre peso, talla, pliegue tricípital, pliegue bicipital, pliegue subescapular y capacidad antioxidante total del plasma. Observamos rectas de regresión significativas entre capacidad antioxidante total del plasma y las variables somatométricas anteriormente citadas en sujetos no portadores de *N. meningitidis*. Sin embargo, esta asociación no existe en los sujetos portadores (Tabla 8.26).

**Tabla 8.26.** Análisis de regresión de regresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante del plasma (variable dependiente) y variables somatométricas en el estrato de edad de mas de 7 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Indice masa corporal	0.21	-0.77	0.05	0.04	1.16	0.29	NS
Área muscular del brazo	0.10	0.17	0.000	0.000	0.78	0.47	NS
Area grasa del brazo	0.08	0.39	-0.001	0.002	0.66	0.53	NS
Indice adiposo-muscular	0.09	0.39	-0.09	0.12	0.72	0.5	NS
Densidad corporal total	0.07	5.70	-5.18	8.28	0.62	0.55	NS
Grasa corporal total	0.009	0.33	-0.004	0.01	0.21	0.84	NS
Peso	0.29	-0.46	0.01	0.01	1.45	0.2	NS
Talla	0.31	-2.87	0.02	0.01	1.49	0.19	NS
Pliegue tricipital	0.13	0.009	0.01	0.02	0.87	0.42	NS
Pliegue bicipital	0.13	-0.003	0.04	0.05	0.88	0.41	NS
Pliegue subescapular	0.008	0.23	0.006	0.03	0.19	0.85	NS
Pliegue suprailiaco	0.01	0.33	-0.002	0.007	0.23	0.82	NS

### 8.2.7.2 Análisis de regresión de la capacidad antioxidante total del plasma y las variables hematológicas en sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*.

**Tabla 8.27.** Análisis de regresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables hematológicas en el estrato de edad de 1 a 3 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Recuento de hematies	0.45	-11.5	0.000	0.000	1.81	0.14	NS
Hemoglobina	0.30	-17.63	1.34	1.03	1.30	0.26	NS
Hematocrito	0.20	-17.8	0.48	0.47	1.01	0.36	NS
Recuento de leucocitos	0.16	-0.58	0.000	0.000	0.89	0.42	NS
Recuento de neutrófilos	0.01	2.04	0.000	0.001	0.22	0.83	NS
Recuento de linfocitos	0.23	-0.40	0.000	0.000	1.11	0.32	NS
Recuento de plaquetas	0.28	-1.76	0.000	0.000	1.24	0.28	NS
Hierro sérico	0.72	9.75	-0.07	0.02	3.24	0.03	*
Trasferrina	0.46	9.75	-0.02	0.01	1.87	0.13	NS
Capacidad fijación de hierro	0.47	9.75	-0.02	0.01	1.89	0.13	NS
Saturación de transferrina	0.15	5.59	-0.14	0.17	0.84	0.44	NS

En las Tablas 8.27 y 8.28 se analizan la regresión lineal en sujetos no portadores y portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables hematológicas en el estrato de edad de 1 a 3 años cumplidos. No encontramos significación estadística en ambas tablas a excepción del hierro sérico en la Tabla 8.27 y el recuento de plaquetas en la Tabla 8.28. Estos hallazgos parecen clínicamente irrelevantes y tiene una significación difícil de definir.



**Tabla 8.28.** Análisis de regresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables hematológicas en el estrato de edad de 1 a 3 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Recuento de hematias	0.45	-0.21	0.000	0.000	1.29	0.32	NS
Hemoglobina	0.50	-0.22	0.02	0.01	1.41	0.29	NS
Hematocrito	0.20	-0.08	0.005	0.008	0.70	0.55	NS
Recuento de leucocitos	0.07	0.10	0.000	0.000	0.39	0.72	NS
Recuento de neutrófilos	0.18	0.09	0.000	0.000	0.66	0.57	NS
Recuento de linfocitos	0.01	0.12	0.000	0.000	0.18	0.87	NS
Recuento de plaquetas	0.95	-0.01	0.000	0.000	6.48	0.02	*
Hierro sérico	0.14	0.17	0.000	0.001	0.72	0.52	NS
Trasferrina	0.05	0.03	0.000	0.001	0.41	0.71	NS
Capacidad fijación de hierro	0.05	0.03	0.000	0.001	0.40	0.71	NS
Saturación de trasferrina	0.16	0.17	-0.002	0.002	0.77	0.49	NS

**Tabla 8.29.** Análisis deregresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables hematológicas en el estrato de edad de 4 a 7 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Recuento de hematias	0.001	0.23	0.000	0.000	0.05	0.96	NS
Hemoglobina	-	-	-	-	-	-	-
Hematocrito	0.04	0.72	-0.01	0.03	0.37	0.73	NS
Recuento de leucocitos	0.95	-0.22	0.000	0.000	8.53	0.004	**
Recuento de neutrófilos	0.42	0.05	0.000	0.000	1.47	0.23	NS
Recuento de linfocitos	0.75	-0.03	0.000	0.000	3.00	0.05	NS
Recuento de plaquetas	0.09	0.25	-0.000	0.000	0.56	0.61	NS
Hierro sérico	0.08	0.21	-0.001	0.002	0.52	0.63	NS
Trasferrina	0.39	1.07	-0.003	0.002	1.39	0.25	NS
Capacidad fijación de hierro	0.40	1.09	-0.003	0.002	1.44	0.24	NS
Saturación de trasferrina	0.02	0.17	-0.001	0.006	0.24	0.82	NS

**Tabla 8.30.** Análisis deregresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables hematológicas en el estrato de edad de mas de 7 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Recuento de hematias	0.17	-2.18	0.000	0.000	1.02	0.35	NS
Hemoglobina	0.10	-1.60	0.14	0.19	0.75	0.48	NS
Hematocrito	0.21	-2.78	0.07	0.06	1.17	0.29	NS
Recuento de leucocitos	0.01	0.75	0.000	0.000	0.24	0.81	NS
Recuento de neutrófilos	0.04	0.17	0.000	0.000	0.49	0.64	NS
Recuento de linfocitos	0.18	1.25	0.000	0.000	1.07	0.33	NS
Recuento de plaquetas	0.07	-0.28	0.000	0.000	0.63	0.55	NS
Hierro sérico	0.001	0.56	0.000	0.006	0.07	0.94	NS
Trasferrina	0.01	1.27	-0.002	0.01	0.22	0.83	NS
Capacidad fijación de hierro	0.01	1.27	-0.002	0.008	0.23	0.82	NS
Saturación de trasferrina	0.18	-0.09	0.02	0.02	0.94	0.39	NS

En las Tablas 8.29, 8.30 y 8.31 se analizan las regresiones lineales en sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma y variables hematológicas en el estrato de edad de 4 a 7 y más de 7 años.

No existe asociación significativa entre las variables de laboratorio analizadas y la capacidad antioxidante total del plasma a excepción del recuento de leucocitos en la Tabla 8.29 de difícil interpretación y también sin significado clínico relevante.

**Tabla 8.31.** Análisis de regresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) y variables hematológicas en el estrato de edad de mas de 7 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Recuento de hematies	0.23	5.25	0.000	0.000	1.23	0.27	NS
Hemoglobina	0.09	2.16	-0.12	0.17	0.72	0.49	NS
Hematocrito	0.06	2.75	-0.05	0.10	0.56	0.59	NS
Recuento de leucocitos	0.10	-0.19	0.000	0.000	0.75	0.48	NS
Recuento de neutrófilos	0.003	0.36	-0.000	0.000	0.12	0.91	NS
Recuento de linfocitos	0.04	0.03	0.000	0.000	0.48	0.64	NS
Recuento de plaquetas	0.04	0.15	0.000	0.000	0.45	0.66	NS
Hierro sérico	0.01	0.46	-0.001	0.006	0.17	0.87	NS
Trasferrina	0.05	0.59	-0.001	0.002	0.41	0.70	NS
Capacidad fijación de hierro	0.29	1.87	-0.004	0.004	1.11	0.34	NS
Saturación de trasferrina	0.008	0.27	0.003	0.001	0.15	0.88	NS

### 8.2.7.3 Análisis de regresión de la capacidad antioxidante total del plasma y las variables nutricionales en sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis*.

Finalmente hemos analizado la regresión lineal en sujetos portadores y no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma e ingesta nutricional en los distintos estratos de edad. No existe asociación significativa entre las distintas variables nutricionales analizadas y la capacidad antioxidante total del plasma tanto en niños no portadores como en portadores de *N.meningitidis* a excepción de la variable ingesta semanal de fruta y verdura en niños no portadores mayores de 7 años de edad.

**Tabla 8.32.** Análisis de regresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) e ingesta nutricional en el estrato de edad de 1-3 años cumplidos.

	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Ingesta de pescado o carne	0.16	-3.77	0.65	1.05	0.62	0.59	NS
Ingesta de bollería	0.10	2.95	-0.12	0.26	0.48	0.67	NS
Ingesta de fruta-verdura	0.06	0.85	0.06	0.17	0.35	0.75	NS
Ingesta de pasta	0.68	3.09	-0.19	0.09	2.07	0.17	NS
Ingesta de lácteos y huevos	0.20	3.33	-0.11	0.16	0.70	0.55	NS

**Tabla 8.33.** Análisis de regresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) e ingesta nutricional en el estrato de edad de 1-3 años cumplidos.

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>	<b>Nivel</b>
Ingesta de pescado o carne	0.48	0.27	-0.01	0.009	1.66	0.19	NS
Ingesta de bollería	0.003	0.13	0.000	0.005	0.09	0.93	NS
Ingesta de fruta-verdura	0.61	0.22	-0.009	0.004	2.19	0.11	NS
Ingesta de pasta	0.33	0.16	-0.004	0.003	1.24	0.30	NS
Ingesta de lácteos y huevos	0.66	0.39	-0.01	0.006	2.43	0.09	NS

**Tabla 8.34.** Análisis de regresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) e ingesta nutricional en el estrato de edad de 4-7 años cumplidos.

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>	<b>Nivel</b>
Ingesta de pescado o carne	0.91	5.38	-0.23	0.07	3.27	0.18	NS
Ingesta e bollería	0.38	-1.55	0.12	0.15	0.79	0.57	NS
Ingesta de fruta-verdura	0.003	0.57	0.007	0.12	0.05	0.96	NS
Ingesta de pasta	0.03	0.77	-0.05	0.27	0.18	0.88	NS
Ingesta de lácteos y huevos	0.03	0.46	0.01	0.19	0.05	0.96	NS

En la siguiente tabla se evidencia asociación positiva entre la ingesta semanal de fruta y verdura y la capacidad antioxidante total del plasma. Si se aumenta la ingesta de fruta y verdura que son fuente nutricional de antioxidantes aumenta significativamente la capacidad antioxidante total del plasma. Este dato sólo se objetiva en sujetos no portadores mayores de 7 años.

**Tabla 8.35.** Análisis de regresión lineal en sujetos no portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) e ingesta nutricional en el estrato de edad de más de 7 años cumplidos.

	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>t</b>	<b>p</b>	<b>Nivel</b>
Ingesta de pescado o carne	0.007	0.58	-0.01	0.08	0.14	0.89	NS
Ingesta e bollería	0.09	1.02	-0.03	0.05	0.55	0.61	NS
Ingesta de fruta-verdura	0.94	-0.86	0.13	0.01	7.03	0.006	**
Ingesta de pasta	0.38	0.81	-0.07	0.05	1.35	0.26	NS
Ingesta de lácteos y huevos	0.34	1.33	-0.04	0.03	1.26	0.29	NS

**Tabla 8.36.** Análisis de regresión lineal en sujetos portadores de *N. meningitidis* entre capacidad antioxidante total del plasma (variable dependiente) e ingesta nutricional en el estrato de edad de más de 7 años cumplidos.

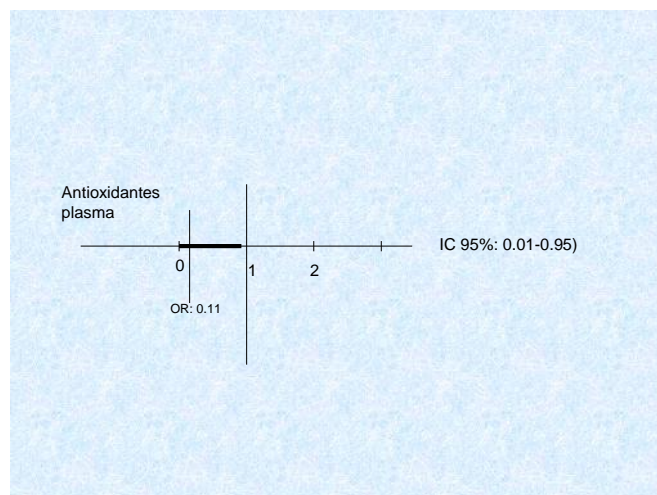
	R <sup>2</sup>	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Ingesta de pescado o carne	0.10	0.17	-0.005	0.007	0.69	0.52	NS
Ingesta e bollería	0.02	0.07	0.002	0.008	0.30	0.77	NS
Ingesta de fruta-verdura	0.15	0.18	-0.005	0.006	0.85	0.44	NS
Ingesta de pasta	0.17	0.16	-0.01	0.01	0.91	0.41	NS
Ingesta de lácteos y huevos	0.07	0.08	0.002	0.004	0.57	0.59	NS

### 8.2.8. Análisis de regresión logística.

Se ha efectuado un análisis de regresión logística tomando la variable “portador de *N. meningitidis*” como variable dependiente, se han valorado una a una todas las variables somatométricas, bioquímicas y nutricionales, tan sólo la variable capacidad antioxidante total del plasma permite adelantar un ligero efecto protector del nivel de antioxidantes del plasma sobre el estado de portador de *N. meningitidis* con OR (razón de odds) de 0.11 (IC95%: 0.01-0.95).

**Tabla 8.37.** Análisis de regresión logística para la capacidad antioxidante total del plasma y estado de portador de *N. meningitidis*.

	Cte.	B	EE (B)	Wald	p	OR (IC 95%)
<b>Modelo 1</b>						
Capacidad antioxidante del plasma	0.80	-2.18	1.09	4.0	<b>0.04</b>	<b>0.11 (0.01-0.95)</b>



**Figura 8.10.** Esquema de la regresión logística para la variable dependiente estado de portador y actividad antioxidante del plasma.

Con posterioridad se realizó una regresión logística ajustada por las diferentes variables nutricionales, se pudo comprobar que en ninguno de los modelos propuestos las variables nutricionales se comportaron como variables de ajuste y/o variables de interacción.

**Tabla 8.38.** Modelos de ajuste para el análisis de regresión logística de la capacidad antioxidante total del plasma y variables nutricionales.

<b>Modelo 2 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	3.64	-5.56	3.38	2.70	0.10	0.04 (0-2.92)
Ingesta semanal huevos-leche	3.64	-0.12	0.10	1.58	0.21	0.88 (0.72-1.07)
<b>Modelo 3 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	-	-4.94	2.73	3.29	0.07	0.007 (0-1.49)
Ingesta semanal fruta-verdura	-	0.18	0.13	1.88	0.17	1.20 (0.92-1.55)
<b>Modelo 4 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	1.33	-5.15	3.73	1.91	0.16	0.06(0-8.65)
Ingesta semanal de bollería	1.33	-0.002	0.08	0	0.98	0.99(0.85-1.17)
<b>Modelo 5 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	2.03	-6.08	4.20	2.10	0.15	0.002(0-8.50)
Ingesta semanal de pasta	2.03	-0.08	0.09	0.75	0.39	0.92(0.77-1.10)
<b>Modelo 6 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95 %)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	1.58	-5.01	3.73	1.86	0.17	0.006(0-9.20)
Ingesta semanal de pescado - carne	1.58	-0.02	0.10	0.56	0.81	0.97(0.80-1.19)

**Tabla 8.39.** Modelos de ajuste para el análisis de regresión logística de la capacidad antioxidante total del plasma y variables somatométricas.

<b>Modelo 2 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	0.39	-2.48	1.26	3.85	0.05	0.08 (0.007-0.99)
Pliegue subescapular	0.39	0.05	0.07	0.51	0.471	1.05 (0.91-1.21)
<b>Modelo 3 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	-0.04	-3.43	1.77	3.72	0.05	0.03 (0.001-1.05)
Peso	-0.04	0.04	0.03	1.88	0.17	1.20 (0.98-1.11)
<b>Modelo 4 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	-1.41	-2.73	1.32	4.27	0.03	0.06(0.005-0.86)
Talla	-1.41	0.02	0.01	1.37	0.24	1.02(0.98-1.05)

**Tabla 8.39 (Cont.).** Modelos de ajuste para el análisis de regresión logística de la capacidad antioxidante total del plasma y variables somatométricas.

<b>Modelo 5 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	-0.61	-3.11	1.53	4.14	0.04	0.04(0.002-0.89)
Pliegue bicipital	-0.61	0.25	0.19	1.81	0.17	1.29(0.89-1.87)
<b>Modelo 6 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	-0.52	-3.15	1.56	4.07	0.04	0.04(0.002-0.91)
Pliegue tricpital	-0.52	-0.13	0.09	1.92	1.16	1.14(0.94-1.37)
<b>Modelo 7 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	0.34	-2.89	3.69	4.07	0.05	0.05(0.003-1.05)
Pliegue suprailiaco	0.34	-0.05	1.36	1.92	0.24	1.27(0.25-1.20)
<b>Modelo 8 de ajuste</b>	<b>Cte.</b>	<b>B</b>	<b>EE (B)</b>	<b>Wald</b>	<b>p</b>	<b>OR (IC 95%)</b>
Capacidad antioxidante del plasma	57.6	-3.13	1.51	4.29	0.03	0.04(0.002-0.91)
Densidad corporal total	57.6	-53.8	34.04	2.50	0.11	0.00(0.00-396043)

En las anteriores Tablas se considera el ajuste por algunas de las variables que se asociaron en el análisis de regresión lineal con la variable capacidad antioxidante total del plasma. Ninguno de los modelos de ajuste disminuyeron de forma relevante el error estándar ni el intervalo de confianza 95%, por lo que podemos concluir que no ajustan de forma satisfactoria la regresión inicial propuesta en la Tabla 8.37.

## **9. DISCUSSION**





## DISCUSIÓN

---

### 9.1. Analisis de la prevalencia de portador asintomático de *N. meningitidis* en una comarca rural de la provincia de Granada.

Hemos estudiado la prevalencia del estado de portador de *N. meningitidis* en una población infantil de 1 a 14 años y hemos obtenido tasas de prevalencia similares a las comunicadas por otros autores en situación de endemia (165). Como ya han comunicado otros autores (166), la prevalencia del estado de portador depende de un lado de la duración del estado de portador en cada individuo, condicionado por las características particulares de las cepas circulantes en la colectividad y el estado inmunológico del huésped; y de otro de la tasa de adquisición de la bacteria, dependiente a su vez de las características de los contactos, naturaleza del contacto y características de las cepas. En situaciones de endemia la duración normal del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* puede oscilar entre varias semanas a varios meses, por lo general menos de 1 año. Lógicamente el incremento de la duración del estado de portador nasofaríngeo del microorganismo incrementa las posibilidades de:

- a) Se transmita el microorganismo a otros sujetos susceptibles (166).
- b) Se establezcan intercambios de material genético con otros microorganismos comensales de la nasofaringe (135).
- c) Pueda ocurrir diseminación hematogena del microorganismo ante eventuales disminuciones del estado inmunológico del huésped.

De cualquiera de las formas, lo que subyace en un estado de portador prolongado es una respuesta inmunitaria defectuosa que permite el mantenimiento nasofaríngeo de la bacteria más tiempo del deseado, por no haberse desarrollado los mecanismos inmunológicos neutralizantes adecuados (131). *N. meningitidis* al igual que otras bacterias gram negativas catalasa positivas tiene la facultad de sobrevivir en el medio intracelular, ello en virtud de su facultad de segregar catalasa que neutraliza la actividad de peróxido de hidrógeno de las células fagocíticas. Por ello, además de los anticuerpos circulantes con actividad bactericida, la inmunidad celular tiene un papel importante en la erradicación de *N. meningitidis* de la nasofaringe.

Desde que a finales de la década de los sesenta se demostró la existencia de una relación inversamente proporcional entre la presencia de anticuerpos bactericidas y la incidencia de enfermedad meningocócica, se acepta que la inmunidad humoral

constituye la principal barrera defensiva frente a la enfermedad meningocócica. La mayor prevalencia de portadores de *N. meningitidis* en los primeros años de vida se justifica por la baja presencia de anticuerpos bactericidas, consecuencia de la ausencia de contactos previos con la bacteria e inmadurez inmunológica de los lactantes de menor edad (167). Sin embargo, el aumento de prevalencia de *N. meningitidis* en torno a la segunda década de vida no puede ser explicado de forma razonable con las premisas anteriores; de hecho se ha justificado por la progresiva escolarización de los sujetos y el incremento de la transmisibilidad del microorganismo en estos entornos cerrados. Nuestros datos al igual que los de otros autores (133;168), muestran un aumento de la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* al final de la primera década de vida (Figura 8.7). Durante este periodo (7 a 14 años) al igual que en el periodo previo (3 a 7 años) de menor prevalencia, los niños están escolarizados y el entorno de juego, al ser poblaciones pequeñas con una única escuela, es común en todos ellos. En nuestros resultados observamos un 10.3% de portadores en sujetos menores de 3 años, con una disminución de la prevalencia durante la infancia para experimentar un repunte al final de la adolescencia, dado que nuestra muestra incluye únicamente niños hasta la edad de 14 años no observamos el incremento de prevalencia que otros autores (133;168) han comunicado a partir de esta edad. Por tanto, otros condicionantes deben estar necesariamente implicados en el repunte de prevalencia al final de la primera década de vida.

La importancia del hábitat intracelular de *N. meningitidis* en la persistencia del estado de portador asintomático de *N. meningitidis* y su posterior desarrollo de patogenicidad ha sido reconocida por diversos autores (134), se sabe que de esta forma la bacteria puede eludir los mecanismos humorales de defensa del huésped (IgA, complemento) y el aclaramiento mucociliar. En esta situación los linfocitos T se convierten en una línea de defensa del huésped decisiva frente al estado de portador asintomático de *N. meningitidis*. Estudios como el publicado por Cemerski S. y cols. (169), han observado que estas líneas celulares ven disminuida su actividad en situaciones de estrés oxidativo aumentado.

Nuestros datos muestran que el 6.5% de los niños estudiados son portadores asintomáticos de *N. meningitidis*, estos datos coinciden con los comunicados por otros autores para la población general en situaciones de baja endemia. Roberts J. y cols (170), estudiaron los distintos métodos de toma de muestra para aislar la *N. meningitidis*; para estos autores los frotis nasofaríngeos tomados a través de la nariz eran menos propensos a ser positivos que los frotis faríngeos tomados por la boca. En nuestro estudio, como se describe en el apartado de Material y Método, las muestras se tomaron de orofaringe tras contacto secuencial con pilares amigdalinos y faringe posterior. Un estudio realizado por Hoeffler D.F. (171), demostró que si los frotis se tomaban de la pared posterior de la faringe aislaban *N. meningitidis* con más frecuencia que si el frotis era tomado de las amígdalas (32.2% vs 19.4%). De igual forma, el rendimiento en el medio de transporte después de una demora en la siembra de más de 5 horas disminuye de forma sustancial los resultados positivos. La evidencia sugiere que el aislamiento de la *N. meningitidis* aumenta si la toma se toma de la pared posterior de la faringe a través de la boca y los frotis se siembran directamente en cultivo ó utilizar un medio de transporte durante un período de tiempo < 5 horas. En nuestro estudio, para mejorar la rentabilidad del aislamiento de *N. meningitidis* y evitar falsos negativos, tomamos la muestra directamente de la pared posterior de la faringe a través de la boca,

la colocamos en medio de transporte Stuart a 37 ° C hasta su siembra en agar Mueller – Hinton antes de las 5 horas de la recogida.

J. McLennan y cols. (147), estudiaron la influencia de determinados comportamientos sociales en la prevalencia de portador de *N. meningitidis* entre adolescentes británicos. El estudio que recogió cerca de 14000 frotis tomados de la faringe de los adolescentes británicos, encontró 2319 portadores (16.7%). Esta prevalencia es mayor a la observada en nuestro estudio al centrarse su muestra exclusivamente en adolescentes de 15 a 19 años de edad. Entre los factores de riesgo para el estado de portador, se describe la asistencia a bares, los besos íntimos y el tabaquismo. Cuando ninguno de estos factores esta presente el aislamiento de *N. meningitidis* fue de 7,8%, valores próximos a los observados en nuestra muestra, frente a un 32.8% en los sujetos en que concurrían dichos factores de riesgo. Al igual que el tabaquismo activo, el tabaquismo pasivo también se relacionó con un riesgo más alto para ser portador. Para J. McLennan y cols (147), el uso de antibióticos se asoció negativamente con el riesgo de ser portador, seria por lo tanto un factor protector. En nuestro estudio, el consumo de antibióticos en las 2 semanas previas es un factor de exclusión, lo que explicaría porque no observamos asociación con esta variable.

Pavlopoilou I.D. y cols. (172), analizaron los portadores de *N. meningitidis* en niños griegos. Analizaron frotis bucofaríngeos en 554 niños de 2-19 años que asisten a guarderías, escuelas primarias y secundarias de la zona centro de Atenas. Se identificaron además los factores de riesgo para ser portador, observando que 22 (4%) de los niños eran portadores de *N. meningitidis*. 7 cepas pertenecían al serogrupo C, y 5 al serogrupo B. Sólo la edad >12 años aumentó el riesgo de ser portador con un aumento de prevalencia del 9.27%. No hubo diferencias estadísticamente significativas en relación al sexo, encontrándose 13 portadores de 272 hombres y 9 portadoras de 282 mujeres. Estas observaciones coinciden con las de nuestro estudio en lo referente al género, no observándose diferencias estadísticamente significativas en el estado de portador entre niños y niñas, si bien según se deduce de los datos de la Tabla 8.17, la prevalencia de portador es discretamente mayor, aunque no estadísticamente significativa, entre los niños. En el estudio de Pavlopoilou y cols., el antecedente de infección viral en la vía aerea superior, que en otros estudios (173) aumentan la tasa de portadores, se relacionó con una disminución en la prevalencia de portadores.

Bogaert D. y cols. (144), investigaron la prevalencia de *N. meningitidis* en 3200 niños holandeses de 1-19 años en 2002. La prevalencia fue del 1.5%, muy por debajo de la encontrada en nuestro estudio. El pico de prevalencia se presentó en niños con 1 año de edad y en mayores 15 años. Los factores de riesgo encontrados fueron las visitas regulares a discotecas (OR 4.3) y un factor hasta entonces no comunicado como el ser portador de neumococo (OR 4.1). Demostró un aumento del crecimiento de *S. pneumoniae* en cocultivo con *N. meningitidis* mediada por la catalasa producida por el meningococo. Se estudiaron además las siguientes variables como posibles factores de riesgo: edad, tamaño de la familia, realización de actividades deportivas más de 3 horas semanales, asistencia a discotecas, tabaquismo activo y/o pasivo, uso reciente de antibióticos (en los últimos 7 días) y cocolonización con *S. pneumoniae* y *S. aureus*. Estos autores obtuvieron los siguientes resultados: el tamaño medio de las familias fue de 4.3 personas, con un promedio de 2.4 hijos por familia. En el 45% de los hogares una persona fuma con regularidad. El 42% de los niños de 14 años participan en

actividades deportivas (3 horas a la semana). El 21% visitó discotecas durante 13 h / semana. En nuestro estudio no se analizaron las actividades deportivas de los niños. Se aislaron meningococos del serogrupo B (8 niños), serogrupo C (9 niños), 24 niños eran portadores del serogrupo X, Y, Z, o W135. La incidencia baja podría estar en relación con el método de recogida de muestra. Además, la siembra diferida en lugar de la siembra directa podría haber disminuido la sensibilidad de detección de la *N. meningitidis* como hemos comunicado anteriormente. También se realizó la recogida de muestras en verano y esta estacionalidad podría explicar la baja prevalencia de portadores.

Las tasas de prevalencia van del 10% al 35% en adultos jóvenes (136;145), estos autores observan que en un momento u otro los jóvenes tienen contacto con el meningococo en su garganta y en poblaciones cerradas y semi-cerradas, tales como militares y estudiantes universitarios, se produce un aumento de la transmisión, con tasas de portadores que pueden llegar a ser del 100% (145;174). Para algunos autores (173), las personas con infecciones de las vías respiratorias pueden convertirse en portadores con mayor facilidad. Igualmente, el tabaco, así como el bajo nivel socioeconómico parecen aumentar el riesgo para ser portador (148).

Cinco de los serogrupos de *N. meningitidis* (A, B, C, W135 e Y) causan más del 90% de la enfermedad invasiva en todo el mundo (175). Por el contrario, casi el 50% de las cepas aisladas carecen de cápsula y, por tanto son serológicamente no serogrupables (135;176). La pérdida de la cápsula mejoraría la capacidad de colonización del meningococo y aumentaría la posibilidad de hacerse portador. En nuestra muestra la mayoría de las cepas de *N. meningitidis* aisladas son no serogrupables, no hemos observado ningún caso de serogrupo C, lo que se explicaría por la alta cobertura vacunal de la población estudiada frente al serogrupo C, que es superior al 95%.

La meningitis meningocócica produce una importante carga de enfermedad en el África subsahariana. Mueller J.E. y cols. (177), estudiaron la asociación de infección respiratoria de vías altas, humedad ambiental y el riesgo de ser portador de meningococo en Burkina Fasso. Durante la temporada de meningitis no epidémica de 2003 tomaron frotis faríngeos a 488 personas de 4 a 29 años de edad. Este estudio se comparó con otro realizado a 624 personas de 1 a 39 años de edad durante una epidemia de meningitis por meningococo A en 2006. El cinturón de la meningitis se caracteriza por la alta incidencia de meningitis epidémica durante la estación seca (de diciembre a mayo) debido principalmente al serogrupo A. Durante el estudio del año 2003 aislaron 152 cepas de las 2.327 muestras analizadas. La distribución por serogrupos fue la siguiente: W135 = 28, X = 5, Y = 3 y 116 eran no serogrupables. La prevalencia de las cepas no serogrupables aumentó de 1.6% en febrero al 8.6% en mayo - junio, mientras que los meningococos encapsulados mostraron una prevalencia constante del 1.5%. La humedad del aire se incrementó del 16% en febrero al 55% en junio. De este estudio se desprende que el incremento de la humedad se asoció con un mayor riesgo de adquisición de meningococos no encapsulados. Carecemos de información sobre la prevalencia de cepas no serogrupables en el entorno rural o urbano en nuestro medio. Durante marzo 2006 se examinaron 624 muestras de sujetos sanos. La prevalencia fue del 22%. La distribución por serogrupos fue del 15% para el meningococo A (N = 95), el 6% para el Y (N = 35), y 0.6% para meningococos no serogrupables (N = 4). No se aislaron los serogrupos B, C, W135 o X. El análisis de

los datos de 2003 permite observar asociación entre la humedad del aire y el riesgo de ser portador. Hay doble riesgo de adquisición de meningococos no serogrupables con humedad ambiental mayor del 40%. Hay evidencias que apoyan la relación causal entre la baja humedad del aire durante la estación seca y la meningitis meningocócica A pues la invasión es más frecuente si las bacterias colonizan la mucosa faríngea dañada por el clima seco (178). La humedad parece favorecer el transporte de cepas no serogrupables que son menos patógenas. Según estos autores, las intervenciones para reducir la meningitis epidémica durante la estación seca podrían dirigirse a reducir los efectos nocivos del aire seco. Así, la humidificación de habitaciones ó los lavados nasales durante la estación seca serían medidas que disminuirían la prevalencia de portadores en estos países africanos. En Burkina Faso, se encontró además evidencia que apoya una relación entre las infecciones del tracto respiratorio y el riesgo de ser portador de meningococos.

Boisier P. y cols. (179), aislaron una cepa de meningococo W-135 como causante de meningitis en Níger. Realizaron un estudio para ver la prevalencia de la cepa y encontraron una tasa de portadores del 35%.

Caugant D.A y cols. (180), estudiaron portadores faríngeos de *N. meningitidis* en niños y adolescentes de 2 a 19 años de edad en Uganda. El estudio se realizó en el año 2003 y se aislaron 15 cepas de una muestra de 750 individuos. La prevalencia obtenida fue del 2 %, inferior a la observada en nuestra muestra, la mayoría de las cepas fueron no serogrupables y ninguna fue del serogrupo A. La cepa W135 se aisló en dos personas. La prevalencia más alta (4.7%) se encontró en el grupo de edad 16 a 19 años.

Troter C.L. y cols. (181) analizaron la historia natural de la enfermedad meningocócica, según estos autores un individuo puede albergar al serogrupo B en la garganta hasta en 4 ocasiones, en 6 ocasiones a la *Neisseria lactamica* y en 0.5 ocasiones al serogrupo C. De lo que se deduce que una persona puede estar colonizada por bacterias del género *neisseria* hasta en 10 ocasiones en los primeros 30 años de vida, circunstancia que explicaría la aparente disminución del riesgo de presentar enfermedad meningocócica conforme aumenta la edad. Las personas que nunca han sido portadoras no tienen el beneficio de la inmunidad a través de episodios previos de portadores. Por el contrario, individuos que previamente hayan sido portadores han desarrollado algún tipo de protección frente a *N. meningitidis*.

Cardeñosa y cols. (133), realizaron un estudio en portadores de *N. meningitidis* en Cataluña. El estudio se llevó a cabo entre mayo de 1998 y abril de 1999. Un total de 364 contactos de 87 pacientes con meningitis fueron estudiados. 61 contactos eran portadores de *N. meningitidis*. Las cepas aisladas fueron 40 B, 10 C, Z 1 y 10 cepas eran no tipables. Estos autores observaron una prevalencia de portadores de *N. meningitidis* del 16%, dos o tres veces mayor que la observada en la población general. En este estudio la muestra estaba sesgada al estudiar exclusivamente contactos directos de pacientes que habían tenido enfermedad invasiva. Estos autores estudian como posibles factores de riesgo de portador las siguientes variables: sexo, edad, infección previa en el mes anterior de las vías respiratorias superiores, uso de antibiótico durante el mes anterior, tamaño de la casa (m<sup>2</sup>), exposición pasiva al humo del tabaco (para niños), tabaquismo activo (para adultos), clase social, y hábitat (urbano:> 10.000 habitantes; rural: <10.000 habitantes). Las variables que mostraron valor significativo fueron la

clase social, con una tasa más alta de portadores (18,8%) en los trabajadores manuales y no cualificados, fumadores activos, cuando el número de cigarrillos diarios fue superior a 20, el hacinamiento cuando el tamaño de los hogares era inferior a 50 m<sup>2</sup> y la edad entre 5 y 9 años. Esta prevalencia es superior a la que se encuentra en la población general, que se estima 5 - 10%. En un estudio previo de portadores de *N. meningitidis* en la población escolar de Cataluña (168), se obtuvo una tasa de prevalencia creciente que subió al 11.3% en el grupo de 13 a 14 años. Sorprendentemente en el estudio de Cardeñosa (133), se encuentra una mayor prevalencia entre 5 - 9 años de edad (15,4%). Nuestros datos ofrecen una tasa de prevalencia del 10.3 % en < 3 años para disminuir al 3.9 % en niños de 4 - 7 años y ofrecer de nuevo un repunte a partir de los 7 años con un 5.3 %. En cualquier caso nuestra muestra se refería a una población general sana, en tanto el trabajo de Cardeñosa sólo analiza casos de niños que eran contactos directos de sujetos con enfermedad meningocócica, previa a la administración de rifampicina como profilaxis.

Yazdankhah SP y cols (182) realizan un estudio de portadores e interpretan que la ausencia de cápsula en las cepas de meningococos en la nasofaringe puede ayudar a disminuir la inmunidad humana y por lo tanto la selección de la cepa para sobrevivir y colonizar la nasofaringe. La gran diversidad de cepas de meningococo en comparación con cepas hipervirulentas, apoya la idea de que la transmisibilidad, no invasión, es esencial en el ciclo de vida de *N. meningitidis*. La investigación del estado de portador puede contribuir de manera significativa a nuestra comprensión de la epidemiología y la patogenia de la enfermedad causada por *N. meningitidis*. Los portadores aumentan rápidamente entre los universitarios estudiantes en el primer mes del año académico y gran parte de este aumento se produce probablemente durante la primera semana (183). Estos mismos autores refieren un porcentaje mayor de hombres entre los portadores; este dato se evidencia en nuestro estudio en el que hay un predominio de niños 58.8% respecto a niñas 41.2 %, aunque esta diferencia no adquiere valor estadísticamente significativo.

Germinario C. y cols. (184), estudian los portadores de *N. meningitidis* en Puglia (Italia). El objetivo de este estudio es determinar la tasa de portadores y los serogrupos de *N. meningitidis* circulantes entre los estudiantes de la Universidad de Bari. La muestra comprendía un total de 583 estudiantes, de los cuales 390 eran mujeres y 193 eran hombres con edades comprendidas entre los 19 y los 53 años. Identificaron 12 cepas de *N. meningitidis* que supuso una prevalencia del 2.05%. La edad media de los portadores fue de 23 años. Los serogrupos encontrados fueron: 9 cepas no tipables, 1 cepa pertenecía a serogrupo B, 1 cepa W135 y 1 cepa Y. La tasa de portadores fue inferior a la de otros estudios realizados en Europa y USA. La desaparición del serogrupo C podría estar relacionado con la inmunidad inducida por las políticas de vacunación, aspecto que hemos referido en relación a nuestra muestra. En definitiva, la prevalencia de los portadores de *N. meningitidis* es muy variable, así como la distribución del serogrupo de los casos fluctuando según la región geográfica, por grupos de edad y con el tiempo. Estudios de portadores son importantes para mejorar nuestra comprensión de la estructura de la población de *N. meningitidis* y la epidemiología de la enfermedad meningocócica.

## 9.2. Análisis de las repercusiones del índice de masa corporal y capacidad antioxidante del plasma sobre el estado de portador de *N. meningitidis*.

En los últimos 15 años se ha asistido a un aumento progresivo en la prevalencia de obesidad y sobrepeso, que en algunos países industrializados alcanza frecuencias próximas al 30% de la población infantil (185). El sobrepeso, la obesidad y en general el aumento de la adiposidad es un factor que se ha relacionado con el aumento del riesgo aterógeno y cardiovascular, pero además bajos niveles de antioxidantes se han implicado en la modificación oxidativa del LDL-colesterol, un proceso necesario para la formación de la placa de ateroma. Existe por tanto una relación inversa observada por diversos autores (186), entre niveles de vitamina E, carotenos en plasma y riesgo cardiovascular. El sobrepeso y la obesidad, se entienden hoy día como un proceso inflamatorio, donde se facilitaría la acción de diversos mediadores favorecedores de la lipoperoxidación y la inflamación. Existe cierto consenso en que las leptinas, producidas principalmente por el tejido adiposo, ejercen cierto papel proinflamatorio, induciendo un aumento del estrés oxidativo en células epiteliales (187). El estudio de Reirman A. y cols (186), demuestra que los pacientes obesos tienen niveles significativamente más bajos de antioxidantes liposolubles (vitamina E y carotenos) que los pacientes con índice de masa corporal normal. El mecanismo que explica el descenso de vitaminas liposolubles en pacientes obesos no está del todo claro planteándose diversas teorías. De un lado algunos autores (188), propugnan una menor biodisponibilidad de estas vitaminas al quedar secuestradas en un tejido adiposo anormalmente aumentado en sujetos obesos. Otros autores (189), relacionan los fenómenos inflamatorios observados con una situación mantenida de hiperinsulinemia, habitual en los pacientes obesos, con el consumo de antioxidantes circulantes. Existe una relación directa entre los niveles de insulina plasmática y la circulación de peróxidos lipídicos, con relaciones inversas entre insulina plasmática y los niveles de tocoferol y caroteno plasmáticos. La inflamación subclínica que inicialmente se inicia en los tejidos adiposos como consecuencia de la infiltración por células inmunocompetentes representa uno de los mecanismos etiopatogénicos típicos del desarrollo de la diabetes tipo 2. Las células inmunocompetentes en conjunción con los adipocitos representan una de las principales vías de liberación de mediadores proinflamatorios que interfieren con la señalización del receptor de la insulina. Algunos estudios (190), han sugerido que la síntesis de óxido nítrico podría jugar algún papel en este proceso. La obesidad se relaciona con aumento de la síntesis de óxido nítrico con la subsiguiente sobreproducción de radicales libres y algunos estudios de investigación (190), han demostrado que la inhibición de la síntesis de óxido nítrico atenua la insulín resistencia. Estudios experimentales recientemente publicados (191), demuestran que la dieta con elevados niveles de antioxidantes en su composición pueden incrementar la capacidad antioxidante total del plasma en sujetos obesos. En nuestro estudio nosotros comparamos la ingesta de frutas-verdura entre pacientes obesos y no obesos y no obtuvimos diferencias significativas.

El repunte de prevalencia de *N. meningitidis* en una etapa en que las variables somatométricas estudiadas experimentan un crecimiento acelerado, nos hace retomar la hipótesis según la cual podría existir una relación entre las fases de crecimiento rápido propias de la adolescencia y el aumento de las demandas metabólicas de moléculas antioxidantes, que se traduciría en un mayor estrés oxidativo e hiporrespuesta inmunológica. Bien es cierto que otros factores epidemiológicos de riesgo como la

pertenencia a colectividades, tabaquismo, infecciones víricas, factores todos ellos ya descritos por otros autores (133;168), cobran especial importancia durante la segunda década de vida.

Uberos J. y cols. (192), pudieron comprobar que el contenido en antioxidantes de la sangre periférica disminuía significativamente en portadores de *N. meningitidis*, situación que de forma indirecta indicaría un mayor consumo de moléculas antioxidantes en portadores asintomáticos de *N. meningitidis* como expresión de una situación de estrés oxidativo acelerado. Diversos estudios (193), han observado una relación de causa-efecto entre hiporrespuesta inmunológica y estrés oxidativo, y han comprobado como las situaciones de hiporrespuesta inmunológica se normalizaban con tratamientos antioxidantes.

Dada la estrecha relación existente entre la prevalencia de portadores en la población y el desarrollo de epidemias por *N. meningitidis*, nos parece del mayor interés conocer todos los posibles factores de riesgo que pudieran influir sobre el estado de portador. Los aspectos nutricionales y somatométricos no han sido tradicionalmente estudiados en este sentido. No parece descabellado pensar a priori que si el balance redox del organismo puede relacionarse con el estado de portador de *N. meningitidis* (194), el estado nutricional del individuo debe tener igualmente importancia en este sentido. Diversos autores (147;172), han descrito un aumento de la prevalencia de portadores de *N. meningitidis* durante la adolescencia, periodo donde, además de la confluencia de factores de riesgo de tipo social, observamos en nuestros días una alta prevalencia de sobrepeso y obesidad (185). Con este punto de partida hemos querido comprobar la contribución del sobrepeso y la obesidad sobre el riesgo del estado portador de *N. meningitidis* en una población infantil.

En nuestro estudio del total de la muestra, un 10.7 % eran obesos y un 11.7% tenían sobrepeso según los criterios de Cole T.J. y cols. (164), sin diferencias estadísticamente significativas entre niños y niñas, aunque observándose un aumento lineal del porcentaje de obesidad con la edad. En nuestro estudio realizamos la valoración de la influencia del índice de masa corporal (IMC) en los 3 estratos de edad definidos en capítulos anteriores y en las categorías de IMC normal, con sobrepeso y obesos, según los puntos de corte definidos por TJ Cole y cols. (164). Observamos que un 22.4 % presentaban sobrepeso y obesidad, porcentaje ligeramente inferior a lo documentado en Andalucía que con cifras del 30% ha promovido la implantación del Plan Integral de Obesidad Infantil. Nosotros hemos tomado como categoría de referencia los sujetos sin sobrepeso y realizamos un análisis de tendencias estratificado por edad, observando una tendencia estadísticamente significativa a aumentar el riesgo de portador de *N. meningitidis* con el aumento del IMC. No existen en la literatura actual aportaciones en este sentido. Jounio U. y cols. (195), observan mayor prevalencia de portadores de *St. Pneumoniae* entre sujetos asmáticos, estos autores comparan el índice de masa corporal entre portadores y no portadores y no observan diferencias significativas; el único factor que se asocia con mayor riesgo de portador es el asma bronquial, factor que otros autores si han relacionado con una asociación significativa con la obesidad y mayor estrés oxidativo (196-197). Estas observaciones referidas a adultos y obesos logran establecer una relación entre índice de masa corporal, obesidad y riesgo aterogénico. Por otro lado, el inicio puberal podría marcar el inicio de cambios en la actividad antioxidante del plasma de niños y niñas; Chiang K, y cols. (198), han comunicado que los estrógenos a concentraciones fisiológicas pueden



actuar como prooxidantes, favoreciendo por tanto la peroxidación de las lipoproteínas de densidad media circulantes y su eliminación hepática del torrente sanguíneo. No obstante en nuestra muestra no encontramos diferencias significativas entre actividad antioxidante de niños y niñas en este estrato de edad.

De nuestros resultados se puede deducir que el riesgo de ser portador de *N. meningitidis* en niños obesos es tres veces mayor que en los niños sin sobrepeso (IC 95%: 1.3-9.9), con una tendencia a incrementar el riesgo de ser portador con el aumento del IMC. El sobrepeso, la obesidad y en general el aumento de la adiposidad se han implicado como factores favorecedores de la lipoperoxidación, aumento del estrés oxidativo y la inflamación (199). Anteriores estudios (192), permitieron demostrar una disminución de la capacidad antioxidante total del plasma en niños portadores de *N. meningitidis*, estas observaciones nos han sugerido la hipótesis de que los sujetos portadores de *N. meningitidis* tienen un balance oxidativo favorable a los prooxidantes con consumo compensador de moléculas antioxidantes (36).

Diversas propiedades del huésped como el porcentaje de grasa corporal o el estado nutricional podrían: a) modificar propiedades de la bacteria que intervienen en su adhesión al epitelio, en la colonización de mucosas y en su transmisibilidad o virulencia; en este sentido, ensayos realizados in vitro por nuestro grupo (200), mostraron que la adición de antioxidantes a un medio de cultivo modificaban las propiedades hidrofóbicas de la bacteria y en consecuencia su capacidad de adhesión a epitelios; y b) modificar la respuesta inmunitaria local del huésped, favoreciendo su permanencia en la nasofaringe y el estado de portador.

Desde un punto de vista estructural, podemos considerar el crecimiento como el resultado de todos aquellos procesos metabólicos que conducen a un incremento de la masa tisular; este proceso conlleva consumo de energía, oxígeno y generación de radicales libres que deben ser adecuadamente detoxificados por las célula (9). Con el objetivo de mantener un equilibrio entre generación de radicales libres y consumo de antioxidantes se utilizan mecanismos antioxidantes enzimáticos (intracelulares) y no enzimáticos (plasmáticos), que de forma global son los valorados en el presente estudio.

Otros estudios (201), han comunicado la existencia de una asociación positiva entre irritantes, como el humo del tabaco o infecciones faríngeas de repetición, y el estado de portador asintomático de *N. meningitidis*. Las razones de esta asociación no se han aclarado, y sin duda se deben implicar tanto la efectividad de los mecanismos de aclaramiento mucociliar o la capacidad fagocitaria de polimorfonucleares. Nuestros datos muestran un balance oxidativo en plasma de los sujetos portadores de *N. meningitidis* inclinado hacia el lado de los prooxidantes, es decir existe déficit relativo de antioxidantes. Se sabe que el mantenimiento de esta situación dificulta una adecuada respuesta inmunológica (33;131). De hecho en pacientes tumorales también se ha observado un déficit relativo de antioxidantes y se ha podido comprobar como el tratamiento con antioxidantes mejora la respuesta inmunológica de forma sustancial. No debe pues extrañar que un balance deficitario de antioxidantes plasmáticos dificulte una efectiva y rápida eliminación de *N. meningitidis* de la nasofaringe.

La actividad antioxidante del plasma que evaluamos en nuestra muestra por el método de Lusignolli y cols (163;202) evalúa los sistemas antioxidantes contenidos en

la fase lipofílica e hidrofílica del plasma. Estas moléculas están en continua regeneración y su equilibrio se implica en la génesis de cada vez más procesos patológicos (203). Sin embargo, hasta el presente no se han podido definir valores óptimos de actividad antioxidante del plasma, y tampoco existe acuerdo sobre métodos estandarizados para su medida. Ello hace imposible dar indicaciones sobre niveles deficitarios u óptimos y en esta situación todo lo que podemos hacer es definir niveles de grupos poblacionales a priori sanos y compararlos con los observados en otros estratos poblacionales. De esta forma hemos observado niveles de actividad antioxidante del plasma inferiores en nuestro grupo de sujetos portadores de meningococo; obviamente no podemos inferir causalidad en tanto no comprobemos que tras normalizarse los niveles de antioxidantes hasta niveles observados en el grupo de no portadores no se revierte la situación de portador de *N. meningitidis*.

La determinación de la actividad antioxidante mediante la técnica colorimétrica con crocin, fue desarrollada por S. Lussignoli y cols. (163), y posteriormente se han publicado modificaciones automatizadas del mismo procedimiento (202). Esta técnica tiene como principal ventaja la de evaluar la actividad antioxidante del plasma independientemente de que se conozcan o no, los antioxidantes implicados, presentando una precisión del 4.8%; además las muestras de plasma pueden ser conservadas en congelación hasta su medida sin que ello modifique los resultados de la prueba. De acuerdo con los artículos publicados por otros autores (163), la capacidad antioxidante de plasma humano normal, expresado como el recíproco de la capacidad de inhibición del 50% (IC50) resultó en un valor medio de  $0,37 \pm 0,06$ . Hemos analizado la asociación entre la capacidad antioxidante total del plasma inferior a la media - 2 DS y el estado de portador de *N. meningitidis*. En el estado de portador, la odds ratio para esta asociación (capacidad antioxidante total del plasma por debajo de la media - 2 DS resultó significativa con valor de 8,44 (IC 95%: 1,5 - 48,9). No existen en la literatura mundial hasta el momento hallazgos en este sentido para poder contrastar nuestros hallazgos.

## CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

---

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis doctoral y considerando los pocos estudios de portadores de *N. meningitidis* en nuestra zona, permiten adelantar las siguientes conclusiones:

**1<sup>a</sup>.** La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* en la comarca granadina estudiada se sitúa en el 6.5%, similar a la observada en otras áreas geográficas de baja endemia.

**2<sup>a</sup>.** La prevalencia de portadores de *N. meningitidis* asciende hasta un 11.5% entre los menores de 3 años de edad, con disminuciones sustanciales en las cifras de prevalencia hasta los 7 años con un repunte del 5.7% a partir de los 7 años.

**3<sup>a</sup>.** Aunque algunos autores han referido diferencias significativas en las prevalencias de portadores entre niños y niñas, en nuestro proyecto de tesis doctoral no observamos diferencias estadísticamente significativas en relación al género.

**4<sup>a</sup>.** Existe una tendencia significativa a aumentar el riesgo de portador de *N. meningitidis* en sujetos con sobrepeso y obesidad, con riesgo significativamente mayor de portador en pacientes obesos.

**5<sup>a</sup>.** Los sujetos portadores de *N. meningitidis* tienen una capacidad antioxidante total del plasma inferior a la de los pacientes no portadores. Esta asociación se hace más acusada entre los menores de 3 años de edad. Pensamos que esta situación podría favorecer respuestas inmunitarias alteradas en el huésped y una mayor persistencia nasofaríngea de *N. meningitidis*.

**6<sup>a</sup>.** Aunque la capacidad antioxidante total del plasma puede estar influida por una ingesta suficiente de frutas y verduras, en nuestra muestra no observamos asociación significativa con este parámetro.

**7<sup>a</sup>.** El consumo de antibióticos en los 2 meses previos al hisopado nasofaríngeo no se relaciona en nuestra muestra con una menor prevalencia del estado de portador asintomático de *N. meningitidis*. Pensamos que este periodo considerado en nuestro estudio es suficientemente amplio como para permitir un recambio de la flora orofaríngea comensal que podría interferir con el estado de portador de *N. meningitidis*.

**8<sup>a</sup>.** Por último, según se desprende de los puntos anteriores evidenciamos:

- a. Capacidad antioxidante del plasma más baja en sujetos portadores de *N. meningitidis*.
- b. Tras ajuste por grupos de edad, mayor prevalencia de portadores en sujetos con sobrepeso y obesos.

## **ABREVIATURAS**





## ABREVIATURAS

---

a.a. : aminoácido

AEP: Asociación Española de Pediatría

AGB: área grasa del brazo

AMB: área muscular del brazo

Amt: melatonina

Aox: antioxidantes

Ca<sup>2+</sup>:calcio

CATP: capacidad antioxidante total del plasma

Cl: cloro

cm: centímetro

cm<sup>2</sup>: centímetro cuadrado

CMI: concentración mínima inhibitoria

CO<sub>2</sub>: anhídrido carbónico

Cu<sup>2+</sup>: cobre

CD44: receptor para la adherencia de bacterias gramnegativas

CFA/I: factor de colonización para E. Coli ( adhesina)

CFA/II: factor de colonización de E. Coli ( adhesina)

C18:1n9: ácido oleico

C18:2n6: ácido linoleico

C20:4n6: ácido araquidónico

C22:6n3: ácido decosahexanoico

DC: densidad corporal

dl: decilitro

DNA: ácido desoxirribonucleico

DS: desviación estándar

ERO: especies reactivas de oxígeno

EMRSA: cepas estafilococo meticilin resistente epidémicas

Fe<sup>2+</sup>: hierro ferroso

Fe<sup>3+</sup>: hierro férrico  
GCT: grasa corporal total  
GPR: glutatión reductasa  
GPX: glutatión peroxidasa  
gr: gramo  
Hb: hemoglobina  
HDLc: lipoproteínas alta densidad colesterol  
Hto.: hematocrito  
H<sub>2</sub>O: agua  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogeno  
HO<sub>2</sub>&: radical perhidroxilo  
HO: radical hidroxilo  
IAM: índice adiposo muscular  
IC 50: capacidad inhibitoria al 50%  
Ig: inmunoglobulina  
im : intramuscular  
IMC: índice de masa corporal  
Kb: kilobases  
Kg: kilogramos  
K-88: factor patogénico de adhesión a E. Coli  
K-92: antígeno capsular de E. Coli  
K-99: factor patogénico de adhesión de E. Coli  
LCR: líquido cefalorraquídeo  
LDLc: lipoproteínas baja densidad colesterol  
LOOH: hidroperóxidos lipídicos  
LOO&: radical lipídico peroxilo  
LOS: lipooligosacárido  
LPS: lipopolisacárido  
m : metro  
m<sup>2</sup>: metro cuadrado  
mcgr: microgramo  
mcL: microlitro  
mgr: miligramos  
min.: minuto

mL: mililitro  
mm: milímetro  
mm<sup>3</sup>: milímetros cúbico  
ngr: nanogramo  
NO: óxido nítrico  
O<sub>2</sub>: oxígeno  
<sup>1</sup>O<sub>2</sub>: oxígeno singlete  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: anión superóxido  
OMP: proteínas de membrana externa  
OR: odds ratio  
PB: perímetro del brazo  
PBP<sub>S</sub>: proteína fijadora de penicilina  
PCR: proteína C reactiva  
PCR: reacción en cadena de polimerasa  
PGH<sub>2</sub>: prostaglandina H<sub>2</sub>  
PGG<sub>2</sub>: prostaglandina G<sub>2</sub>  
Plb: pliegue bicipital  
PlSe: pliegue subescapular  
PlSi: pliegue suprailíaco  
Plt: pliegue tricipital  
PMN: polimorfonucleares  
RBC: recuento de hematíes  
REDOX: Oxido- reducción  
RL: radicales libres  
RO: radical alcoxilo  
ROO: radical peroxilo  
ROOH: hidroperóxidos  
rpm: revoluciones por minuto  
RP62A: S. epidermidis productora de slime  
RX: rayos X  
RP62A-NA: S. epidermidis no productora de slime  
RR: riesgo relativo  
seg.: segundo

SH: grupo sulfidrilo

SMRSA: cepas estafilococo meticilin resistente esporádicas

SOD: superóxido dismutasa

Stx 2 : toxina Shiga de E. Coli

TA: tensión arterial

TAC: tomografía axial computerizada

TbP: proteína fijadora de transferrina

T<sup>a</sup>: temperatura

Z.B.S. : Zona Básica de Salud

μ: micra

°C: grado centígrado

## **BIBLIOGRAFIA**



## BIBLIOGRAFIA

---

- (1) Dona Diaz JL, Bueno SA, Martinez VA. Anthropometric parameters of weight, height and head circumference in Malaga schoolchildren. *An Esp Pediatr* 1990 Sep;33(3):229-32.
- (2) Karlberg J. A biologically-oriented mathematical model (ICP) for human growth. *Acta Paediatr Scand Suppl* 1989;350:70-94.
- (3) Bueno MM, Herbermann M, Claudio T, Frontera N. Integrating information systems between an acute care setting and a home care setting. *Healthc Inf Manage* 1996;10(2):69-74.
- (4) Tojo R. [The assessment of growth and development]. *An Esp Pediatr* 1991 Dec;35 Suppl 47:26-36.
- (5) Serra-Majem L, Ribas L, Perez-Rodrigo C, Garcia-Closas R, Pena-Quintana L, Aranceta J. Determinants of nutrient intake among children and adolescents: results from the enKid Study. *Ann Nutr Metab* 2002;46 Suppl 1:31-8.
- (6) Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992 Jul 27;307(1):108-12.
- (7) Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 1991 Dec 15;69(21-23):965-8.
- (8) Fridovich I. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J Biol Chem* 1989 May 15;264(14):7761-4.
- (9) Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993 Jul;49(3):481-93.
- (10) McCord JM. Free radicals and heart disease. *Bibl Nutr Dieta* 1989;(43):327-37.
- (11) Chance B, Villringer A, Dirnagl V, Einhaupl KM. Optical imaging of brain function and metabolism. Garmisch-Partenkirchen, 21-22 October 1991. *J Neurol* 1992 Aug;239(7):359-60.
- (12) Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973 Jul;134(3):707-16.

- (13) Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochim Biophys Acta* 1982 Feb 15;710(2):197-211.
- (14) Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985;5:365-90.
- (15) Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993 May;57(5 Suppl):715S-24S.
- (16) Kanofsky JR, Sima P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem* 1991 May 15;266(14):9039-42.
- (17) Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 1975 Jul 1;54(3):311-4.
- (18) Aw TY, Ookhtens M, Kaplowitz N. Mechanism of inhibition of glutathione efflux by methionine from isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1986 Sep;251(3 Pt 1):G354-G361.
- (19) Bracci R. Calcium involvement in free radical effects. *Calcif Tissue Int* 1992 Dec;51(6):401-5.
- (20) Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca<sup>2+</sup> in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989 Jul;10(7):281-5.
- (21) Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986 Dec;59(6):612-9.
- (22) Duran N, Gisler GC, Diaz J. Chemiluminescence from an erythrocyte folic acid oxidase from normal individuals and from cancer patients. *Physiol Chem Phys Med NMR* 1984;16(4):325-31.
- (23) Flitter WD. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull* 1993 Jul;49(3):545-55.
- (24) Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984 Mar;73(3):599-601.
- (25) Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993 Jul;49(3):506-22.
- (26) Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991 Aug;21(4):361-74.
- (27) Minotti G, Aust SD. The requirement for iron (III) in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 1987 Jan 25;262(3):1098-104.



- (28) Poli G. Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull* 1993 Jul;49(3):604-20.
- (29) Thornalley PJ, Wolff SP, Crabbe MJ, Stern A. The oxidation of oxyhaemoglobin by glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Biochem J* 1984 Feb 1;217(3):615-22.
- (30) Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* 1990 Jul 30;268(1):69-71.
- (31) Roche E, Romero-Alvira D. [Changes in DNA induced by oxidative stress]. *Med Clin (Barc)* 1996 Feb 3;106(4):144-53.
- (32) Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. [Aging mechanisms of proteins]. *Diabete Metab* 1991 Jan;17(1):1-16.
- (33) Stadtman ER, Oliver CN. Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1991 Feb 5;266(4):2005-8.
- (34) Bindoli A. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1988;5(4):247-61.
- (35) Curtis MT, Gilfor D, Farber JL. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Arch Biochem Biophys* 1984 Dec;235(2):644-9.
- (36) Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993;14(3):191-7.
- (37) Dobretsov GE. [Fluorescent probe study of the spatial structure of membranes and lipoproteins]. *Ukr Biokhim Zh* 1984 Mar;56(2):211-22.
- (38) McGrath LT, Douglas AF, McClean E, Brown JH, Doherty CC, Johnston GD, et al. Oxidative stress and erythrocyte membrane fluidity in patients undergoing regular dialysis. *Clin Chim Acta* 1995 Mar 31;235(2):179-88.
- (39) Schroeder F. Role of membrane lipid asymmetry in aging. *Neurobiol Aging* 1984;5(4):323-33.
- (40) Archibald FS, Duong MN. Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*. *Infect Immun* 1986 Feb;51(2):631-41.
- (41) Monte M, Davel LE, de Lustig ES. Inhibition of lymphocyte-induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 1994 Sep;17(3):259-66.
- (42) Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1985;57:357-417.
- (43) Beutler E. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annu Rev Nutr* 1989;9:287-302.

- (44) Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma. *Lancet* 1982 Aug 7;2(8293):327.
- (45) Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendez-Pelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a free radical scavenger: implications for aging and age-related diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1994 May 31;719:1-12.
- (46) Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993;17(3):347-57.
- (47) Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlow-Walden L, Chuang J, et al. A review of the evidence supporting melatonin's role as an antioxidant. *J Pineal Res* 1995 Jan;18(1):1-11.
- (48) Kennaway DJ, Goble FC, Stamp GE. Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1996 Apr;81(4):1525-32.
- (49) Pierpaoli W, Yi C. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. I. Thymus-mediated, immunoreconstituting and antiviral activity of thyrotropin-releasing hormone. *J Neuroimmunol* 1990 May;27(2-3):99-109.
- (50) Lemus-Wilson A, Kelly PA, Blask DE. Melatonin blocks the stimulatory effects of prolactin on human breast cancer cell growth in culture. *Br J Cancer* 1995 Dec;72(6):1435-40.
- (51) Reiter R, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997;60(25):2255-71.
- (52) Matuszak Z, Reszka K, Chignell CF. Reaction of melatonin and related indoles with hydroxyl radicals: EPR and spin trapping investigations. *Free Radic Biol Med* 1997;23(3):367-72.
- (53) Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990 Jul;280(1):1-8.
- (54) Garcia JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, Escames G, Yu BP, Oh CS, et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1997 May 26;408(3):297-300.
- (55) Barlow-Walden LR, Reiter RJ, Abe M, Pablos M, Menendez-Pelaez A, Chen LD, et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem Int* 1995 May;26(5):497-502.
- (56) Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocr Res* 1992;18(2):91-113.
- (57) Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* 1991 Jan;8(2):211-8.

- (58) Gibbons RJ, Qureshi JV. Virulence-related physiological changes and antigenic variation in populations of *Streptococcus mutans* colonizing gnotobiotic rats. *Infect Immun* 1980 Sep;29(3):1082-91.
- (59) Horska E, Pokorny J, Labajova M. Effect of cultivation medium on some physicochemical parameters of outer bacterial membrane. *Microbios* 1995;81(329):203-11.
- (60) Pintor M, Ferron L, Gomez JA, Powell NB, Ala'Aldeen DA, Borriello SP, et al. Blocking of iron uptake from transferrin by antibodies against the transferrin binding proteins in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1996 Mar;20(3):127-39.
- (61) Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Petzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL. Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and disease in humans. *J Clin Microbiol* 1999 Mar;37(3):497-503.
- (62) Sellwood R, Gibbons RA, Jones GW, Rutter JM. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to pig intestinal brush borders: the existence of two pig phenotypes. *J Med Microbiol* 1975 Aug;8(3):405-11.
- (63) Evans DG, Evans DJ, Jr., Tjoa WS, DuPont HL. Detection and characterization of colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea. *Infect Immun* 1978 Feb;19(2):727-36.
- (64) Smith HW, Huggins MB. The influence of plasmid-determined and other characteristics of enteropathogenic *Escherichia coli* on their ability to proliferate in the alimentary tracts of piglets, calves and lambs. *J Med Microbiol* 1978 Nov;11(4):471-92.
- (65) Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, Falkow S. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* 1981 Dec 17;294(5842):665-7.
- (66) McIntyre J, Rowley D, Jenkin CR. The functional heterogeneity of macrophages at the single cell level. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1967 Dec;45(6):675-80.
- (67) Beachey EH, Seyer JM, Dale JB, Simpson WA, Kang AH. Type-specific protective immunity evoked by synthetic peptide of *Streptococcus pyogenes* M protein. *Nature* 1981 Jul 30;292(5822):457-9.
- (68) Heinzelmann M, Herzig DO, Swain B, Mercer-Jones MA, Bergamini TM, Polk HC, Jr. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997 Nov;4(6):705-10.
- (69) Pruimboom IM, Rimler RB, Ackermann MR. Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. *Infect Immun* 1999 Mar;67(3):1292-6.

- (70) McCarthy RA, Hay ED. Collagen I, laminin, and tenascin: ultrastructure and correlation with avian neural crest formation. *Int J Dev Biol* 1991 Dec;35(4):437-52.
- (71) Naito Y, Tohda H, Okuda K, Takazoe I. Adherence and hydrophobicity of invasive and noninvasive strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1993 Aug;8(4):195-202.
- (72) Zabel LT, Neuer A, Manncke B. Fibronectin binding and cell surface hydrophobicity contribute to adherence properties of group B streptococci. *Zentralbl Bakteriell* 1996 Sep;285(1):35-43.
- (73) Wilkens K, Tiemann B, Bazan F, Ruger W. ADP-ribosylation and early transcription regulation by bacteriophage T4. *Adv Exp Med Biol* 1997;419:71-82.
- (74) Van Wamel WJ, Vandenbroucke-Grauls CM, Verhoef J, Fluit AC. The effect of culture conditions on the in-vitro adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 1998 Aug;47(8):705-9.
- (75) Gutierrez-Fernandez J. [Bacterial adherence as a virulence factor in sepsis]. *An Med Interna* 1989 Sep;6(9):489-96.
- (76) Fowler JE, Jr., Stamey TA. Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VII. The role of bacterial adherence. *J Urol* 1977 Apr;117(4):472-6.
- (77) Svanborg-Eden C. [Antibodies in the secretion can modify the adhesiveness of bacteria on mucous membrane areas]. *Lakartidningen* 1979 Oct 3;76(40):3400-1.
- (78) Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 1988 Mar;52(1):134-52.
- (79) Silverblatt FJ, Ofek I. Influence of pili on the virulence of *Proteus mirabilis* in experimental hematogenous pyelonephritis. *J Infect Dis* 1978 Nov;138(5):664-7.
- (80) Whitnack E, Bisno AL, Beachey EH. Hyaluronate capsule prevents attachment of group A streptococci to mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1981 Mar;31(3):985-91.
- (81) Selinger DS, Reed WP. Pneumococcal adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 1979 Feb;23(2):545-8.
- (82) Bartelt MA, Duncan JL. Adherence of group A streptococci to human epithelial cells. *Infect Immun* 1978 Apr;20(1):200-8.
- (83) Craven DE, Frasch CE, Robbins JB. Meningococcal vaccines and disease due to other serogroups. *Lancet* 1978 Oct 28;2(8096):939-40.
- (84) Gutierrez-Fernandez J. [Bacterial adherence as a virulence factor in sepsis]. *An Med Interna* 1989 Sep;6(9):489-96.

- (85) Bose B. Pseudomonas immunoglobulin and vaccine in burn patients. *Lancet* 1981 Feb 21;1(8217):435.
- (86) Cohen C, Phillips GN, Jr. Spikes and fimbriae: alpha-helical proteins form surface projections on microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981 Sep;78(9):5303-4.
- (87) Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1981;35:299-324.
- (88) Marrie TJ, Lam J, Costerton JW. Bacterial adhesion to uroepithelial cells: a morphologic study. *J Infect Dis* 1980 Aug;142(2):239-46.
- (89) Cantey JR, Lushbaugh WB, Inman LR. Attachment of bacteria to intestinal epithelial cells in diarrhea caused by *Escherichia coli* strain RDEC-1 in the rabbit: stages and role of capsule. *J Infect Dis* 1981 Feb;143(2):219-30.
- (90) Peterson PK, Quie PG. Bacterial surface components and the pathogenesis of infectious diseases. *Annu Rev Med* 1981;32:29-43.
- (91) Beachey EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis* 1981 Mar;143(3):325-45.
- (92) Nassif X, Beretti JL, Lowy J, Stenberg P, O'Gaora P, Pfeifer J, et al. Roles of pilin and PilC in adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial and endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994 Apr 26;91(9):3769-73.
- (93) Virji M, Makepeace K, Peak IR, Ferguson DJ, Jennings MP, Moxon ER. Opc- and pilus-dependent interactions of meningococci with human endothelial cells: molecular mechanisms and modulation by surface polysaccharides. *Mol Microbiol* 1995 Nov;18(4):741-54.
- (94) Koomey M, Gotschlich EC, Robbins K, Bergstrom S, Swanson J. Effects of recA mutations on pilus antigenic variation and phase transitions in *Neisseria gonorrhoeae*. *Genetics* 1987 Nov;117(3):391-8.
- (95) Fox EN. M proteins of group A streptococci. *Bacteriol Rev* 1974 Mar;38(1):57-86.
- (96) McGee ZA, Gross J, Dourmashkin RR, Taylor-Robinson D. Nonpilar surface appendages of colony type 1 and colony type 4 gonococci. *Infect Immun* 1976 Jul;14(1):266-70.
- (97) Ryll RR, Rudel T, Scheuerpflug I, Barten R, Meyer TF. PilC of *Neisseria meningitidis* is involved in class II pilus formation and restores pilus assembly, natural transformation competence and adherence to epithelial cells in PilC-deficient gonococci. *Mol Microbiol* 1997 Mar;23(5):879-92.
- (98) Mett H, Kloetzlen L, Vosbeck K. Properties of pili from *Escherichia coli* SS142 that mediate mannose-resistant adhesion to mammalian cells. *J Bacteriol* 1983 Feb;153(2):1038-44.

- (99) Korhonen TK, Leffler H, Svanborg EC. Binding specificity of piliated strains of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* to epithelial cells, *Saccharomyces cerevisiae* cells, and erythrocytes. *Infect Immun* 1981 May;32(2):796-804.
- (100) Firon N, Ofek I, Sharon N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1982 Apr 29;105(4):1426-32.
- (101) Scheuerpflug I, Rudel T, Ryll R, Pandit J, Meyer TF. Roles of PilC and PilE proteins in pilus-mediated adherence of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* to human erythrocytes and endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* 1999 Feb;67(2):834-43.
- (102) Maas WK. Genetic aspects of toxigenesis in bacteria. *Pharmacol Ther* 1981;13(1):205-17.
- (103) Freter RR, Savageau MA. Proofreading systems of multiple stages for improved accuracy of biological discrimination. *J Theor Biol* 1980 Jul 7;85(1):99-123.
- (104) Kaur T, Singh S, Dhawan V, Ganguly NK. *Shigella dysenteriae* type 1 toxin induced lipid peroxidation in enterocytes isolated from rabbit ileum. *Mol Cell Biochem* 1998 Jan;178(1-2):169-79.
- (105) Schragar HM, Alberti S, Cywes C, Dougherty GJ, Wessels MR. Hyaluronic acid capsule modulates M protein-mediated adherence and acts as a ligand for attachment of group A *Streptococcus* to CD44 on human keratinocytes. *J Clin Invest* 1998 Apr 15;101(8):1708-16.
- (106) Jann K, Schmidt G, Blumenstock E, Vosbeck K. *Escherichia coli* adhesion to *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells: role of piliation and surface hydrophobicity. *Infect Immun* 1981 May;32(2):484-9.
- (107) Banai M, Razin S, Brecht W, Kahane I. Isolation of binding sites to glycophorin from *Mycoplasma pneumoniae* membranes. *Infect Immun* 1980 Dec;30(3):628-34.
- (108) McNeish AS, Turner P, Fleming J, Evans N. Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* 1975 Nov 15;2(7942):946-8.
- (109) Smith HW, Parsell Z, Green P. Thermosensitive antibiotic resistance plasmids in enterobacteria. *J Gen Microbiol* 1978 Nov;109(1):37-47.
- (110) Mooi FR, de Graaf FK, van Embden JD. Cloning, mapping and expression of the genetic determinant that encodes for the K88ab antigen. *Nucleic Acids Res* 1979 Mar;6(3):849-65.
- (111) Formal SB, Hornick RB. Invasive *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1978 May;137(5):641-4.
- (112) Bradley DE. Determination of pili by conjugative bacterial drug resistance plasmids of incompatibility groups B, C, H, J, K, M, V, and X. *J Bacteriol* 1980 Feb;141(2):828-37.

- (113) Jones DM, Borrow R, Fox AJ, Gray S, Cartwright KA, Poolman JT. The lipooligosaccharide immunotype as a virulence determinant in *Neisseria meningitidis*. *Microb Pathog* 1992 Sep;13(3):219-24.
- (114) Verheul AF, Snippe H, Poolman JT. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev* 1993 Mar;57(1):34-49.
- (115) Jennings MP, Bisercic M, Dunn KL, Virji M, Martin A, Wilks KE, et al. Cloning and molecular analysis of the *Isi1* (*rfaF*) gene of *Neisseria meningitidis* which encodes a heptosyl-2-transferase involved in LPS biosynthesis: evaluation of surface exposed carbohydrates in LPS mediated toxicity for human endothelial cells. *Microb Pathog* 1995 Dec;19(6):391-407.
- (116) Werner RG, Daneck KH. Possible mechanism of fusidic acid resistance in *E. coli*. *Arzneimittelforschung* 1981;31(5):757-61.
- (117) Beachey EH, Eisenstein BI, Ofek I. Sublethal concentrations of antibiotics and bacterial adhesion. *Ciba Found Symp* 1981;80:288-305.
- (118) Ferreiros CM, Criado MT. Expression of surface hydrophobicity encoded by R-plasmids in *Escherichia coli* laboratory strains. *Arch Microbiol* 1984 Jul;138(3):191-4.
- (119) Eisenstein BI, Ofek I, Beachey EH. Interference with the mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli* by sublethal concentrations of streptomycin. *J Clin Invest* 1979 Jun;63(6):1219-28.
- (120) Scheld WM, Zak O, Vosbeck K, Sande MA. Bacterial adhesion in the pathogenesis of infective endocarditis. Effect of subinhibitory antibiotic concentrations on streptococcal adhesion in vitro and the development of endocarditis in rabbits. *J Clin Invest* 1981 Nov;68(5):1381-4.
- (121) Hermansson J, Iversen T, Lindquist U. Isolation and determination of the diastereomers of the glucuronidated 5-(4-hydroxyphenyl)-5-phenylhydantoin in human urine using HPLC. *Acta Pharm Suec* 1982;19(3):199-210.
- (122) Smyth CJ, Siegel J, Salton MR, Owen P. Immunochemical analysis of inner and outer membranes of *Escherichia coli* by crossed immunoelectrophoresis. *J Bacteriol* 1978 Jan;133(1):306-19.
- (123) Edebo L, Hed J, Kihlstrom E, Magnusson KE, Stendahl O. The adhesion of enterobacteria and the effect of antibodies of different immunoglobulin classes. *Scand J Infect Dis Suppl* 1980;Suppl 24:93-9.
- (124) Stendahl O, Edebo L, Magnusson KE, Tagesson C, Hjerten S. Surface-charge characteristics of smooth and rough *Salmonella typhimurium* bacteria determined by aqueous two-phase partitioning and free zones electrophoresis. *Acta Pathol Microbiol Scand B* 1977 Oct;85B(5):334-40.

- (125) Wrangstadh M, Conway PL, Kjelleberg S. The production and release of an extracellular polysaccharide during starvation of a marine *Pseudomonas* sp. and the effect thereof on adhesion. *Arch Microbiol* 1986 Aug;145(3):220-7.
- (126) Grundstrom T, Jaurin B, Edlund T, Normark S. Physical mapping and expression of hybrid plasmids carrying chromosomal beta-lactamase genes of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1980 Sep;143(3):1127-34.
- (127) Lambden PR, Heckels JE, James LT, Watt PJ. Variations in surface protein composition associated with virulence properties in opacity types of *Neisseria gonorrhoeae*. *J Gen Microbiol* 1979 Oct;114(2):305-12.
- (128) Ellen RP, Gibbons RJ. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun* 1972 May;5(5):826-30.
- (129) Parton R. Envelope proteins in *Salmonella minnesota* mutants. *J Gen Microbiol* 1975 Jul;89(1):113-23.
- (130) Ghuysen JM, Bricas E, Lache M, Leyh-Bouille M. Structure of the cell walls of *Micrococcus lysodeikticus*. 3. Isolation of a new peptide dimer, N-alpha-[L-alanyl-gamma-(alpha-D-glutamylglycine)]-L-lysyl-D-alanyl-N-alpha-[L-alanyl-gamma-(alpha-D-glutamylglycine)]-L-lysyl-D-alanine. *Biochemistry* 1968 Apr;7(4):1450-60.
- (131) Goldschneider I, Gotschlich EC, Artenstein MS. Human immunity to the meningococcus. II. Development of natural immunity. *J Exp Med* 1969 Jun 1;129(6):1327-48.
- (132) Gagneux SP, Hodgson A, Smith TA, Wirth T, Ehrhard I, Morelli G, et al. Prospective study of a serogroup X *Neisseria meningitidis* outbreak in northern Ghana. *J Infect Dis* 2002 Mar 1;185(5):618-26.
- (133) Cardenosa N, Dominguez A, Orcau A, Panella H, Godoy P, Minguell S, et al. Carriers of *Neisseria meningitidis* in household contacts of meningococcal disease cases in Catalonia (Spain). *Eur J Epidemiol* 2001;17(9):877-84.
- (134) Coen PG, Cartwright K, Stuart J. Mathematical modelling of infection and disease due to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica*. *Int J Epidemiol* 2000 Feb;29(1):180-8.
- (135) Ala'Aldeen DA, Neal KR, Ait-Tahar K, Nguyen-Van-Tam JS, English A, Falla TJ, et al. Dynamics of meningococcal long-term carriage among university students and their implications for mass vaccination. *J Clin Microbiol* 2000 Jun;38(6):2311-6.
- (136) Cartwright KA, Stuart JM, Jones DM, Noah ND. The Stonehouse survey: nasopharyngeal carriage of meningococci and *Neisseria lactamica*. *Epidemiol Infect* 1987 Dec;99(3):591-601.



- (137) Pether JV, Lightfoot NF, Scott RJ, Morgan J, Steele-Perkins AP, Sheard SC. Carriage of *Neisseria meningitidis*: investigations in a military establishment. *Epidemiol Infect* 1988 Aug;101(1):21-42.
- (138) Olsen SF, Djurhuus B, Rasmussen K, Joensen HD, Larsen SO, Zoffman H, et al. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* and *Neisseria lactamica* in households with infants within areas with high and low incidences of meningococcal disease. *Epidemiol Infect* 1991 Jun;106(3):445-57.
- (139) Fernandez S, Arreaza L, Santiago I, Malvar A, Berron S, Vazquez JA, et al. Carriage of a new epidemic strain of *Neisseria meningitidis* and its relationship with the incidence of meningococcal disease in Galicia, Spain. *Epidemiol Infect* 1999 Dec;123(3):349-57.
- (140) Trotter CL, Maiden MC. Meningococcal vaccines and herd immunity: lessons learned from serogroup C conjugate vaccination programs. *Expert Rev Vaccines* 2009 Jul;8(7):851-61.
- (141) Christensen H, May M, Bowen L, Hickman M, Trotter CL. Meningococcal carriage by age: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis* 2010 Dec;10(12):853-61.
- (142) Ronne T, Berthelsen L, Buhl LH, Lind I. Comparative studies on pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* during a localized outbreak of serogroup C meningococcal disease. *Scand J Infect Dis* 1993;25(3):331-9.
- (143) Fraser PK, Bailey GK, Abbott JD, Gill JB, Walker DJ. The meningococcal carrier-rate. *Lancet* 1973 Jun 2;1(7814):1235-7.
- (144) Bogaert D, Hermans PW, Boelens H, Sluiter M, Luijendijk A, Rumke HC, et al. Epidemiology of nasopharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in healthy Dutch children. *Clin Infect Dis* 2005 Mar 15;40(6):899-902.
- (145) Caugant DA, Hoiby EA, Magnus P, Scheel O, Hoel T, Bjune G, et al. Asymptomatic carriage of *Neisseria meningitidis* in a randomly sampled population. *J Clin Microbiol* 1994 Feb;32(2):323-30.
- (146) Mossong J, Hens N, Jit M, Beutels P, Auranen K, Mikolajczyk R, et al. Social contacts and mixing patterns relevant to the spread of infectious diseases. *PLoS Med* 2008 Mar 25;5(3):e74.
- (147) MacLennan J, Kafatos G, Neal K, Andrews N, Cameron JC, Roberts R, et al. Social behavior and meningococcal carriage in British teenagers. *Emerg Infect Dis* 2006 Jun;12(6):950-7.
- (148) Davies AL, O'Flanagan D, Salmon RL, Coleman TJ. Risk factors for *Neisseria meningitidis* carriage in a school during a community outbreak of meningococcal infection. *Epidemiol Infect* 1996 Oct;117(2):259-66.
- (149) Conyn-Van Spaendonck MA, Reintjes R, Spanjaard L, van KE, Kraaijeveld AG, Jacobs PH. Meningococcal carriage in relation to an outbreak of invasive disease

- due to *Neisseria meningitidis* serogroup C in the Netherlands. *J Infect* 1999 Jul;39(1):42-8.
- (150) Stuart JM, Cartwright KA, Robinson PM, Noah ND. Effect of smoking on meningococcal carriage. *Lancet* 1989 Sep 23;2(8665):723-5.
- (151) Marks MI, Frasch CE, Shaper RM. Meningococcal colonization and infection in children and their household contacts. *Am J Epidemiol* 1979 May;109(5):563-71.
- (152) Fontanals D, Van ED, Pons I, Pineda V, Sanfeliu I, Mariscal D, et al. [Prevalence of *Neisseria meningitidis* carriers among the population of Cerdanyola (Barcelona)]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995 Aug;13(7):398-405.
- (153) Tayal SC, Rashid S, Muttu KM, Hildreth AJ. Meningococcal carriage: prevalence and sex-related risk factors. *J Infect* 1997 Mar;34(2):101-5.
- (154) National Institute for Health and Clinical Excellence. Bacterial Meningitis and meningococcal septicaemia: Management of bacterial meningitis and meningococcal septicaemia in children and young people younger than 16 years in primary and secondary care. National Collaborating Centre for women's and Children's Health; 2011. Report No.: 102.
- (155) Hellenbrand W, Hanquet G, Heuberger S, Nielsen S, Stefanoff P, Stuart JM. What is the evidence for giving chemoprophylaxis to children or students attending the same preschool, school or college as a case of meningococcal disease? *Epidemiol Infect* 2011 Aug 11;1-11.
- (156) Woodard JL, Berman DM. Prevention of meningococcal disease. *Fetal Pediatr Pathol* 2006 Nov;25(6):311-9.
- (157) Baines PB, Hart CA. Severe meningococcal disease in childhood. *Br J Anaesth* 2003 Jan;90(1):72-83.
- (158) Cemerski S, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur J Immunol* 2003 Aug;33(8):2178-85.
- (159) Cemerski S, Cantagrel A, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Reactive oxygen species differentially affect T cell receptor-signaling pathways. *J Biol Chem* 2002 May 31;277(22):19585-93.
- (160) Frisancho AR. New norms of upper limb fat and muscle areas for assessment of nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1981 Nov;34(11):2540-5.
- (161) Brook CG. Determination of body composition of children from skinfold measurements. *Arch Dis Child* 1971 Apr;46(246):182-4.
- (162) Sann L, Durand M, Picard J, Lasne Y, Bethenod M. Arm fat and muscle areas in infancy. *Arch Dis Child* 1988 Mar;63(3):256-60.

- (163) Lussignoli S, Fraccaroli M, Andrioli G, Brocco G, Bellavite P. A microplate-based colorimetric assay of the total peroxy radical trapping capability of human plasma. *Anal Biochem* 1999 Apr 10;269(1):38-44.
- (164) Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000 May 6;320(7244):1240-3.
- (165) Arreaza L, Vazquez J. [Meningococcus carriers: an enigma at the end of the 20th Century]. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2000 Aug;18(7):352-5.
- (166) Rumiantsev SN, Simeshchenko EP, Pospelov VF, Tatarnikov VM, Shabarov IA, Rogacheva NM, et al. [The range of individual sensitivity to adhesion by *Neisseria meningitidis* serogroup B in young men]. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1995 Jul;(4):17-9.
- (167) Stollenwerk N, Jansen VA. Meningitis, pathogenicity near criticality: the epidemiology of meningococcal disease as a model for accidental pathogens. *J Theor Biol* 2003 Jun 7;222(3):347-59.
- (168) Dominguez A, Cardenosa N, Izquierdo C, Sanchez F, Margall N, Vazquez JA, et al. Prevalence of *Neisseria meningitidis* carriers in the school population of Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect* 2001 Dec;127(3):425-33.
- (169) Cemerski S, van Meerwijk JP, Romagnoli P. Oxidative-stress-induced T lymphocyte hyporesponsiveness is caused by structural modification rather than proteasomal degradation of crucial TCR signaling molecules. *Eur J Immunol* 2003 Aug;33(8):2178-85.
- (170) Roberts J, Greenwood B, Stuart J. Sampling methods to detect carriage of *Neisseria meningitidis*; literature review. *J Infect* 2009 Feb;58(2):103-7.
- (171) Hoeffler DF. Recovery of *Neisseria meningitidis* from the nasopharynx. Comparison of two techniques. *Am J Dis Child* 1974 Jul;128(1):54-6.
- (172) Pavlopoulou ID, Daikos GL, Alexandrou H, Petridou E, Pangalis A, Theodoridou M, et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* by Greek children: risk factors and strain characteristics. *Clin Microbiol Infect* 2004 Feb;10(2):137-42.
- (173) Stephens DS. Uncloaking the meningococcus: dynamics of carriage and disease. *Lancet* 1999 Mar 20;353(9157):941-2.
- (174) Olcen P, Kjellander J, Danielsson D, Lindquist BL. Epidemiology of *Neisseria meningitidis*; prevalence and symptoms from the upper respiratory tract in family members to patients with meningococcal disease. *Scand J Infect Dis* 1981;13(2):105-9.
- (175) Pollard AJ. Global epidemiology of meningococcal disease and vaccine efficacy. *Pediatr Infect Dis J* 2004 Dec;23(12 Suppl):S274-S279.

- (176) Caugant DA, Kristiansen BE, Froholm LO, Bovre K, Selander RK. Clonal diversity of *Neisseria meningitidis* from a population of asymptomatic carriers. *Infect Immun* 1988 Aug;56(8):2060-8.
- (177) Mueller JE, Yaro S, Madec Y, Somda PK, Idohou RS, Lafourcade BM, et al. Association of respiratory tract infection symptoms and air humidity with meningococcal carriage in Burkina Faso. *Trop Med Int Health* 2008 Dec;13(12):1543-52.
- (178) Greenwood B. Manson Lecture. Meningococcal meningitis in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1999 Jul;93(4):341-53.
- (179) Boisier P, Nicolas P, Djibo S, Hamidou AA, Tenebray B, Borrow R, et al. Carriage of *Neisseria meningitidis* serogroup W135 ST-2881. *Emerg Infect Dis* 2006 Sep;12(9):1421-3.
- (180) Caugant DA, Fogg C, Bajunirwe F, Piola P, Twesigye R, Mutebi F, et al. Pharyngeal carriage of *Neisseria meningitidis* in 2-19-year-old individuals in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006 Dec;100(12):1159-63.
- (181) Trotter CL, Gay NJ, Edmunds WJ. The natural history of meningococcal carriage and disease. *Epidemiol Infect* 2006 Jun;134(3):556-66.
- (182) Yazdankhah SP, Caugant DA. *Neisseria meningitidis*: an overview of the carriage state. *J Med Microbiol* 2004 Sep;53(Pt 9):821-32.
- (183) Neal KR, Nguyen-Van-Tam JS, Jeffrey N, Slack RC, Madeley RJ, Ait-Tahar K, et al. Changing carriage rate of *Neisseria meningitidis* among university students during the first week of term: cross sectional study. *BMJ* 2000 Mar 25;320(7238):846-9.
- (184) Germinario C, Tafuri S, Napoli C, Montagna MT, Balducci MT, Fortunato F, et al. Young-adult carriers of *Neisseria meningitidis* in Puglia (Italy): will the pattern of circulating meningococci change following the introduction of meningococcal serogroup C conjugate vaccines? *Hum Vaccin* 2010 Dec;6(12):1025-7.
- (185) Bryans AM. Childhood obesity--prelude to adult obesity. *Can J Public Health* 1967 Nov;58(11):486-90.
- (186) Reitman A, Friedrich I, Ben-Amotz A, Levy Y. Low plasma antioxidants and normal plasma B vitamins and homocysteine in patients with severe obesity. *Isr Med Assoc J* 2002 Aug;4(8):590-3.
- (187) Fantuzzi G, Sennello JA, Batra A, Fedke I, Lehr HA, Zeitz M, et al. Defining the role of T cell-derived leptin in the modulation of hepatic or intestinal inflammation in mice. *Clin Exp Immunol* 2005 Oct;142(1):31-8.
- (188) Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000 Sep;72(3):690-3.

- (189) Facchini FS, Humphreys MH, DoNascimento CA, Abbasi F, Reaven GM. Relation between insulin resistance and plasma concentrations of lipid hydroperoxides, carotenoids, and tocopherols. *Am J Clin Nutr* 2000 Sep;72(3):776-9.
- (190) Touskova V, Haluzik M. [Insulin resistance and nitric oxide: molecular mechanisms and pathophysiological associations]. *Cesk Fysiol* 2011;60(2):40-7.
- (191) Kolomvotsou AI, Rallidis LS, Mountzouris KC, Lekakis J, Koutelidakis A, Efstathiou S, et al. Adherence to Mediterranean diet and close dietetic supervision increase total dietary antioxidant intake and plasma antioxidant capacity in subjects with abdominal obesity. *Eur J Nutr* 2012 Jan 12.
- (192) Uberos J, Molina-Carballo A, Galdo-Munoz G, Munoz-Hoyos A. Total antioxidant capacity of plasma in asymptomatic carrier state of *Neisseria meningitidis*. *Epidemiol Infect* 2007 Jul;135(5):857-60.
- (193) Lissoni P, Barni S, Ardizzoia A, Tancini G, Conti A, Maestroni G. A randomized study with the pineal hormone melatonin versus supportive care alone in patients with brain metastases due to solid neoplasms. *Cancer* 1994 Feb 1;73(3):699-701.
- (194) Uberos J, Alarcon JA, Penalver MA, Molina-Carballo A, Ruiz M, Gonzalez E, et al. Influence of the antioxidant content of saliva on dental caries in an at-risk community. *Br Dent J* 2008 Jul 26;205(2):E5.
- (195) Jounio U, Juvonen R, Bloigu A, Silvennoinen-Kassinen S, Kaijalainen T, Kauma H, et al. Pneumococcal carriage is more common in asthmatic than in non-asthmatic young men. *Clin Respir J* 2010 Oct;4(4):222-9.
- (196) Lugogo NL, Bappanad D, Kraft M. Obesity, metabolic dysregulation and oxidative stress in asthma. *Biochim Biophys Acta* 2011 Nov;1810(11):1120-6.
- (197) Quinto KB, Zuraw BL, Poon KY, Chen W, Schatz M, Christiansen SC. The association of obesity and asthma severity and control in children. *J Allergy Clin Immunol* 2011 Nov;128(5):964-9.
- (198) Chiang K, Parthasarathy S, Santanam N. Estrogen, neutrophils and oxidation. *Life Sci* 2004 Oct 1;75(20):2425-38.
- (199) Hilda SN, Hernandez L, Velazquez C, Rodriguez J, Murillo E. [Asthma and obesity: related inflammatory diseases]. *Rev Alerg Mex* 2007 Jan;54(1):24-8.
- (200) Uberos J, Molina-Carballo A, Fernandez-Puentes V, Rodriguez-Belmonte R, Munoz-Hoyos A. Overweight and obesity as risk factors for the asymptomatic carrier state of *Neisseria meningitidis* among a paediatric population. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010 Mar;29(3):333-4.
- (201) Baines PB, Hart CA. Severe meningococcal disease in childhood. *Br J Anaesth* 2003 Jan;90(1):72-83.

- (202) Kampa M, Nistikaki A, Tsaousis V, Maliaraki N, Notas G, Castanas E. A new automated method for the determination of the Total Antioxidant Capacity (TAC) of human plasma, based on the crocin bleaching assay. *BMC Clin Pathol* 2002 Aug 28;2(1):3.
- (203) Yeum KJ, Russell RM, Krinsky NI, Aldini G. Biomarkers of antioxidant capacity in the hydrophilic and lipophilic compartments of human plasma. *Arch Biochem Biophys* 2004 Oct 1;430(1):97-103.