

Tesis Doctoral



Evaluación de la influencia de la melatonina
vs vitamina E sobre la hidrofobicidad de
superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa
de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*



M^a Carmen Augustin Morales
Universidad de Granada

**Evaluación de la influencia de la melatonina vs
vitamina E sobre la hidrofobicidad de superficie
y adherencia a filtros de nitrocelulosa de
Escherichia coli y *Neisseria meningitidis*.**

Dña. M^a Carmen Augustin Morales



Granada, 8 de Marzo de 2001

1. Índice temático

	Págs.
Capítulo 1. Índice temático	3
Capítulo 2. Dedicatoria y agradecimientos	7
Capítulo 3. Certificaciones	13
Capítulo 4. Abreviaturas	17
4.1. Unidades de medida	19
4.2. Símbolos	20
Capítulo 5. Introducción	25
5.1. Estructura bacteriana	27
5.1.1. Elementos obligados	27
5.1.2. Elementos facultativos	31
5.2. Patogenicidad bacteriana	34
5.2.1. Prerrequisitos para la virulencia	34
5.2.2. Factores antifagocitarios	36
5.2.3. Catabolitos bacterianos	37
5.3. Adhesión bacteriana y patogénesis	38
5.3.1. Genética de la adhesión bacteriana: codificación de estructuras de superficie por plásmidos de resistencia	41
5.3.2. Mecanismos de adhesión: importancia de las interacciones hidrofóbicas y su implicación en la interacción célula-célula	44
5.4. <i>Escherichia coli</i> . Características del microorganismo	47
5.5. <i>Neisseria meningitidis</i> . Características del microorganismo	50
5.6. Radicales libres	53
5.6.1. Radical Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	55
5.6.2. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)	56
5.6.3. Radical Hidroxilo (OH^{\cdot})	56
5.6.4. Oxígeno Singlete (1O_2)	57
5.7. Fuentes de producción de radicales libres	58
5.7.1. Cadena de transporte de electrones mitocondriales	58
5.7.2. Sistema xantino-oxidasa	59

5.7.3. Metabolismo del ácido araquidónico	59
5.7.4. Formación de radicales libres por células fagocíticas	59
5.7.5. Metales iónicos y producción de radicales libres	60
5.7.6. Citocromo P ₄₅₀	61
5.7.7. Contaminantes atmosféricos y radiaciones ionizantes	61
5.8. Estrés oxidativo	61
5.9. Interacción entre radicales libres e hidratos de carbono	62
5.10. Interacciones radicales libres y DNA	63
5.11. Interacciones radicales libres y proteínas	64
5.12. Radicales libres y lípidos	64
5.13. Mecanismos antioxidantes	66
Capítulo 6. Justificación y objetivos	73
Capítulo 7. Material y método	79
7.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	81
7.1.1. <i>Neisseria meningitidis</i>	81
7.1.2. <i>Escherichia coli</i>	81
7.1.3. Conservación de las cepas y utilización	81
7.1.4. Caracterización de las cepas	83
7.1.5. Condiciones de cultivo	83
7.1.6. Incubación con melatonina	84
7.1.7. Incubación con vitamina E	84
7.1.8. Incubación con cloranfenicol a dosis subletales	84
7.2. Medida de la hidrofobicidad de superficie	85
7.3. Adherencia a filtros de nitrocelulosa	85
7.4. Preparación de búfferes	85
7.5. Investigación documental	86
7.6. Método estadístico	87
7.6.1. Estadística descriptiva	87
7.6.2. Inferencia estadística	88
Capítulo 8. Resultados	95
8.1. Descripción de caracteres cuantitativos	97
8.2. Medidas de tendencia central	97
8.3. Medidas de dispersión	98
8.4. Test de Kolmogorov	99
8.5. Análisis descriptivo	99
8.5.1. Descripción estadística de la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de <i>Escherichia coli</i>	99
8.5.2. Descripción estadística de la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de	

<i>Neisseria meningitidis</i>	108
8.6. Inferencia estadística	115
8.6.1. Test de comparación de un conjunto de muestras relacionadas	115
8.6.2. Estudio de correlación ρ_s de Spearman	128
8.6.3. Estudio de regresión lineal	132
Capítulo 9. Discusión	139
9.1. Consideraciones metodológicas sobre la medida de hidrofobicidad de superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa	139
9.2. Consideraciones sobre la medida de hidrofobicidad de superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa en <i>Escherichia coli</i>	143
9.3. Consideraciones sobre la medida de hidrofobicidad de superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa en <i>Neisseria meningitidis</i>	145
Capítulo 10. Conclusiones	153
Capítulo 11. Bibliografía	159

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Dña. M^a Carmen Augustin Morales

2. Dedicatoria y agradecimientos

A mis padres

A mis hermanos

A mis sobrinos

Al finalizar esta memoria de Tesis Doctoral, con todos los esfuerzos, privaciones e ilusiones que ha conllevado, quiero mostrar mi agradecimiento a las personas que han colaborado y han hecho posible que dicho trabajo vea la luz.

En primer lugar destacar lo afortunada que he sido por haber contado con la calidad humana y profesional, de los dos directores de Tesis que he tenido; si volviera hacia atrás, volvería a repetir.

Quiero agradecer al **Prof. D. Antonio Muñoz Hoyos**, su apoyo, su estímulo, su trato, su ayuda, el haber creído en mí desde el comienzo de mi residencia, día a día, tanto en el trabajo asistencial como de investigación.

El haber formado parte de su grupo de investigación, trabajando a su lado, empapándome de ese espíritu positivo, vital y constructivo ante las personas y las realidades de cada día, ha sido para mí un privilegio.

No menos privilegio ha sido contar con la dirección y colaboración estrecha en este trabajo, del **Dr. D. José Uberos Fernández**. No creo que lo que quede aquí escrito sea suficiente para mostrarle mi profundo agradecimiento.

Quiero resaltar su gusto por esclarecer, por conocer, por saber, por descubrir, por dejar cada vez menos puntos oscuros y más espacio para la verdad, y todo ello con un rigor científico y honestidad admirables.

Este trabajo ha sido posible gracias a la colaboración estrecha del Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Granada. Quiero por tanto, agradecer al **Prof. D. Gonzalo Piédrola Gil** que me haya permitido llevar a cabo en este laboratorio con un ambiente humano y profesional favorable, la parte experimental, disponiendo del espacio y material necesario.

Así mismo, quiero resaltar mi gratitud al **Prof. D. José Liébana Ureña**, quien me ha atendido en cualquier momento y para cualquier duda que me ha surgido, facilitándome el trabajo y siempre con esa actitud de acogida y buen trato que le caracterizan.

Mi agradecimiento también a **Elena Roca**, persona que desde el primer día se ha mostrado disponible, prestándome una ayuda eficaz en el laboratorio de Microbiología; con ella todo han sido facilidades. Gracias también a **Rosa, Natalia y Antonio**, residentes de microbiología, quienes me han ofrecido conocimientos, tiempo y disponibilidad.

Agradezco también al **Dr. C.M. Ferreirós Domínguez**, del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de Santiago de Compostela, el haberme proporcionado muchas de las cepas con las que he podido realizar este proyecto.

También al **Prof. D. Juan Antonio Molina Font** que, como Catedrático y Director del Departamento de Pediatría me ha permitido desarrollar y defender esta tesis. Aprovecho este momento para transmitirle mi aprecio y respeto.

Quiero también nombrar aquí a los **Profs. D. Gabriel Galdó Muñoz y D. Antonio Molina Carballo**, personas que se han mostrado cercanas y serviciales siempre que he acudido a ellas; muchas gracias.

El haber llegado hasta aquí ha supuesto, el esfuerzo y la ilusión de mis padres, quienes han hecho todo lo posible por ofrecernos a mis hermanos y a mí las oportunidades que ellos no pudieron tener y nos han mostrado con sencillez y sabiduría un camino y una forma de mirar la vida. Mi profundo y justo agradecimiento.

A mis hermanos, que han deseado y esperado que llegara este momento, siguiendo todo este proceso con interés y que me han apoyado una vez más, quiero expresarles mi gratitud, especialmente a Tusti, a quien aprovechando sus conocimientos lingüísticos, he atosigado a preguntas sobre la redacción de la Tesis interrumpiéndola oportuna e inoportunamente en su trabajo.

Por último, me queda agradecer a mis amigos, la confianza puesta en mí, el acompañamiento, la fuerza que me han dado y la carga que han tenido que soportar cada vez que me he venido abajo. Soy plenamente consciente de lo que me han aportado.

DIRECCIÓN Y CERTIFICACIONES

3. Certificaciones

D. Antonio Muñoz Hoyos, Profesor Titular del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que **Dña. M^a Carmen Augustin Morales**, Licenciada 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: *”Evaluación de la influencia de la melatonina vs vitamina E sobre la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de Escherichia coli y Neisseria meningitidis”*. la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada.

Granada, 17 de Diciembre de 2000

Prof. D. A. Muñoz Hoyos

Dña. M^a Carmen Augustin Morales

D. José Uberos Fernández, Doctor en Medicina por la Universidad de Granada y miembro del Equipo de Investigación CTS-190 de la Universidad de Granada.

CERTIFICA: Que **Dña. M^a Carmen Augustin Morales**, Licenciada 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: *”Evaluación de la influencia de la melatonina vs vitamina E sobre la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de Escherichia coli y Neisseria meningitidis”* la que ha finalizado con todo aprovechamiento, habiendo sido leída y revisada la presente y estando conforme con su presentación para ser juzgada.

Granada, 17 de Diciembre de 2000

Dr. D. J. Uberos Fernández

ABREVIATURAS

4. Abreviaturas

4.1. Unidades de medida.

- cm: centímetro.
- dl : decilitro.
- g : gramo.
- h: hora.
- Kb: kilobases.
- Kcal: kilocaloría.
- Kg: kilogramo.
- l : litro.
- M: mol.
- Mcg: microgramo.
- mM: micromol.
- mEq: miliequivalentes.
- mg : miligramo.
- min: minuto.
- Min.: minuto.
- ml : mililitro.
- mM: milimol.
- mm: milímetro.
- mmol: milimol.
- mOsm: miliosmol.
- μ : micra.
- μ g: microgramo.
- μ l: microlitro.
- μ M: micromol.
- nm : nanometro.
- nM: nanomol.
- ng: nanogramo.
- rpm: revoluciones por minuto.
- s: segundo.
- U I: unidades internacionales.

4.2. Símbolos.

- Ac: ácido.
- ACE: acetamida.
- ADN: ácido dexosiribonucleico.
- ADO: adonitol.
- aMT: melatonina.
- ARA: arabinosa.
- ARG: arginina.
- ARN: ácido ribonucleico.
- B: coeficiente de regresión.
- C20:4n6: ácido araquidónico.
- C18:1n9: ácido oleico.
- C18:2n6: ácido linoleico.
- C22:6n3: ácido docosahexaenoico.
- Ca²⁺: calcio.
- CD44: receptor para la adherencia de bacterias gramnegativas.
- CFA/I: factor de colonización de *E.coli* (adhesina).
- CFA/II: factor de colonización de *E.coli* (adhesina).
- Cl: cloro.
- Chl: cloranfenicol.
- CIT: citrato.
- C.M.I.: concentración mínima inhibitoria.
- CO₂: dióxido de Carbono.
- COU: P-coumaric.
- Cte: constante.
- Cu²⁺: cobre.
- CV: coeficiente de variación.
- Cys: cistina
- D562: células Detroit 562 de carcinoma faringeo.
- DP3: prueba bioquímica que mide la capacidad de fermentación de la glucosa en presencia de inhibidores específicos.
- DS: desviación estándar.
- e: electrón.
- E8775: factor de colonización de *Escherichia coli* (adhesina).
- EDDA-MH: medio Müeller-Hinton con restricción de hierro.
- EE (B): error estándar.
- EMB: medio de cultivo para enterobacterias.
- EMRSA: cepas MRSA epidémicas.
- ENT: factor patogénico de *Escherichia coli*.
- Eq: equivalencia.
- ERO: especies reactivas de oxígeno.

-
- ESC: esculina.
 - Esc-SOD: esculina-superóxido dismutasa.
 - FAC-MH: medio Müeller-Hinton con exceso de hierro.
 - Fe^{2+} : hierro.
 - GC: control de crecimiento.
 - gl: grados de libertad.
 - GM: receptor inhibidor de la adherencia.
 - GLU: glucosa.
 - GPX: glutatión peroxidasa.
 - G-R: glutatión reductasa.
 - GSH: ciclo redox del glutatión.
 - GSSG: glutatión disulfuro oxidado.
 - H_2 : hidrógeno.
 - H_0 : hipótesis nula.
 - H_1 : hipótesis alterna.
 - Hb: Hemoglobina.
 - HClO: ácido hipocloroso.
 - Hg: mercurio.
 - H_2O : agua.
 - H_2O_2 : peróxido de hidrógeno.
 - HO: radical hidroxilo.
 - $\text{HO}_2\cdot$: radical perhidroxilo.
 - HOCl: ácido hipocloroso.
 - H_2S : sulfhídrico.
 - HuCol I: colágeno I humano.
 - Ig: Inmunoglobulina.
 - INO: inositol.
 - IQR: amplitud intercuartil.
 - K-88: factor patogénico de adhesión de *Escherichia coli*.
 - K-99: factor patogénico de adhesión de *Escherichia coli*.
 - K-92: antígeno capsular de *Escherichia coli*.
 - Lac: lactosa.
 - LCR: Líquido cefalorraquídeo.
 - ln: logaritmo neperiano.
 - $\text{LOO}\cdot$: radical lipídico peroxilo.
 - LOOH: hidroperóxidos lipídicos.
 - LOS: lipooligosacárido.
 - LPS: lipopolisacárido.
 - LYS: lisina.
 - M: colonias de aspecto mucoso.
 - MAD: malondialdehído.
 - MAL: malonato.
-

-
- MAN: manitol.
 - MH: Müller-Hinton caldo.
 - MLT: maltosa.
 - Mn: manganeso.
 - MR: fimbrias manosa-resistentes de *Escherichia coli*.
 - MS: fimbrias manosa-sensibles de *Escherichia coli*.
 - MRSA: cepas de *Stafilococcus aureus* meticilin-resistentes.
 - NAD: coenzima.
 - NADPH: coenzima.
 - NO: óxido nítrico.
 - NS: no significativo.
 - O₂: Oxígeno.
 - ¹O₂: oxígeno singlete.
 - OFG: oxidación-fermentación-glucosa.
 - OMP: proteínas de membrana externa.
 - ONP: O-Nitrofenil-β-D-galactopiranosida.
 - ORN: ornitina.
 - Osmol: osmolalidad.
 - OXI: oxidasa.
 - P: adhesina.
 - p: probabilidad.
 - PilC: proteína de *Neisseria gonorrhoeae* implicada en la adherencia.
 - PBP_s: proteínas fijadoras de penicilina.
 - PBS: tampón-fosfato.
 - PCO₂: presión parcial de dióxido de carbono.
 - PGG₂: prostaglandina G₂.
 - PGH₂: prostaglandina H₂.
 - PLI: indoxil-β-D-glucósido.
 - PO₂: presión parcial de oxígeno.
 - PUM: tampón fosfato.
 - PXB: polimixina B.
 - R: radical R-ilo.
 - r: coeficiente de correlación.
 - RAF: rafinosa.
 - Rct: suma de rangos de cada grupo
 - RHA: ramnosa.
 - RO: radical alcoxilo.
 - ROO: radical peroxilo.
 - ROOH: hidroperóxidos
 - RP62A: *S. epidermidis* productora de *slime*.
 - RP62A-NA: *S. epidermidis* no productora de *slime*.
 - S: desviación típica.
-

-
- S^2 : Varianza.
 - SCN: Núcleo supraquiasmático de la hipófisis.
 - Se: selenio.
 - SH: grupo sulfhidrilo.
 - SMRSA: cepas MRSA esporádicas.
 - SOD: superóxido dismutasa.
 - SOR: sorbitol.
 - STEC: cepa de *Escherichia coli* productora de toxina Shiga.
 - Stx 2: toxina Shiga de *Escherichia coli*.
 - SUC: sucrosa.
 - T: rangos.
 - t: Coeficiente comparación de medias (Student).
 - Tbp 1: proteína ligada a la transferrina en la membrana externa de *N. meningitidis*.
 - Tbp 2: proteína ligada a la transferrina en la membrana externa de *N. Meningitidis*.
 - TDA: triftófano.
 - TL: toxina termolábil.
 - TS: toxina termoestable.
 - URE: urea
 - Vit. E: vitamina E.
 - Υ^2 : curtosis.
 - χ^2 : Chi cuadrado.
 - x: media.
 - XYL: xilosa.
 - Zn: Cinc.

INTRODUCCIÓN

5. Introducción

5.1. 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 (1;2). 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.

5.1.1. 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 bilaminar 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 citoplásmica a la que se une en ocasiones mediante invaginaciones, denominadas uniones de Bayer. Entre la capa interna de la membrana externa y la membrana citoplásmica 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 recaídas, con antimicrobianos que actúan sobre la pared.

Membrana citoplásmica: 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.

5.1.2. 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 (1;2).

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 antiopsonina) . 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 patogenidad 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 antigenidad 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 sobretodo 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 (3).

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.

5.2. Patogenicidad bacteriana.

5.2.1. 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 (4).

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. (5), 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 (6).

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 (7). 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 (8).

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 (6).

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 (6), 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. (9), 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 glicolípidica en la mucosa intestinal de los cerdos resistentes a las cepas de *Echerichia coli* K-88 positivas (10). Por otra parte, los trabajos de Smith y Huggins (11), 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 (12).

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 (12).

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 (13). 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 (14).

5.2.2. 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 pyogenes*, en el que la proteína "M" (de superficie) le permite adherirse a las células epiteliales y es determinante de su virulencia. Beachey y col. (15), 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 (16). 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.

La adhesión de *Pasteurella multocida* a monocitos de pavo es mediada por mucopolisacáridos de la cápsula bacteriana. El ácido hialurónico es el mayor componente de la matrix extracelular del huésped, así como el principal componente capsular de las cepas de *Ps. multocida* del serogrupo A (17). Las macromoléculas de la matrix extracelular se cree, están implicadas en la regulación de varias funciones celulares, incluyendo el crecimiento, motilidad, adhesión celular y diferenciación *in*

vitro (18). Estas funciones están mediadas por ácido hialurónico interactuando con los proteoglicanos de la superficie celular expresados sobre varios tipos de células, de las que los macrófagos son una de ellas. Aunque los proteoglicanos se unen con más afinidad al ácido hialurónico, pueden también unirse a fibronectina, colágeno (I, II y IV), y laminina (17).

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 (11), 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. (19), 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 (20). 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 (12).

5.2.3. 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 (11). 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 (12).

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 fosforilación del ADP en el caso de la toxina colérica o sobre la síntesis proteica en el caso de la toxina diftérica (21).

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.

5.3. 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 (22). 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 (23). Algunos estudios resaltan la mayor capacidad de unión de las células epiteliales de pacientes con infecciones graves a bacterias patógenas (24-26). 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 (27).

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 (27) (28) (29) (30) (31) (32), 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 (23). 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 (33).

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 (34;35). 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 (36;37). Los estudios diseñados por Cantey y col. (37), 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 (38) y a los sistemas naturales de defensa del huésped como son la actividad bacteriana del suero y a la fagocitosis (39). 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 (40). 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 (41). Bajo condiciones naturales, los pili representan el único medio para que la *N. meningitidis* capsulada se adhiera a las superficies mucosas humanas (42). Así mismo, los pili han demostrado ser esenciales para el establecimiento de infecciones experimentales por *N. gonorrhoeae* (43).

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 (44).

Interesantes estudios realizados por McGee y col. (45), 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 adhesión de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* a las células epiteliales (46).

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 afin hacia la mucosa intestinal de corderos y vacas, aunque puede también encontrarse ocasionalmente en cepas aisladas de cerdos (47). 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; éstos 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 *Escherichia 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 (48). 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 (49), 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 (50), 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 adhesión 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 (51). 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 (52). 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 (53). 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 (17). Recientemente los CD44 han sido descritos como un receptor para la adherencia del *Streptococcus* del grupo A (54), 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 (55), en *Escherichia 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 (56).

Los estudios realizados por C. Svanborg Edén (57) confirman el papel decisivo de las adhesinas bacterianas para la unión y activación de polimorfonucleares por *Escherichia coli* a través tanto de receptores específicos como de las propiedades físicoquímicas de superficie.

Finalmente, Van Wamel W.J.B. y cols. (22), 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^a 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.

5.3.1. 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 *Escherichia coli*; en tanto que los factores de adhesión que más frecuentemente se relacionan con la patogenicidad suelen ser codificados por plásmidos (58), 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 (59). 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 (60).

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. (61), 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 (62), 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 5.1.
Caracteres de algunas fimbrias que median la adherencia (63).

Adhesina Fimbria	Serotipo F	Origen de la cepa	Genes	Receptor (inh. Adherencia)	Aglutinación
Manosa-sensibles Tipo 1	F ₁	Ubicuo	Cromosoma	Glicoproteínas D-Manosa	Hematíes de cobayo, caballo, cordero, humanos y levaduras
Manosa-resistente K88	F ₂	Enteropatógenos Diarrea de lechones	Plásmido	Glicolípidos Gangliósido GM ₁	Hematíes Pollo y cobayo
K99	F ₃	Diarrea de bóvidos	Plásmido	Gangliósido GM ₂	Caballo y cordero
987P	F ₄	Diarrea de lechones	Plásmido	-	-
CFAI	F ₅	Diarrea humana	Plásmido	Gangliósido GM ₂	Humanos, pollo, bovinos
CFAII	F ₆	Diarrea humana	Plásmido	-	Bovinos, pollo
E8775	-	Diarrea humana	Plásmido	-	Bovinos
P		Uropatógenos Infección urinaria (90%)	Cromosoma	Globotetraosyl cerámico	Humano
Otras fimbrias	F ₇ -F ₁₀	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 (64). 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 (51).

El lipopolisacárido (LPS) de *Neisseria meningitidis* se sabe que es el principal determinante de su virulencia (65), 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 (66). 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 (67). 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 (68). 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 (55;69). 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 (69;70).

Por lo que respecta a los antibióticos betalactámicos, Beachey y col. (69), han demostrado una disminución de la adhesividad manosa resistente en *Escherichia coli* después de crecer en concentraciones subletales de penicilina G. La ampicilina posee un efecto negativo en la adhesividad de algunas cepas uropatógenas de *Escherichia coli* según se desprende de los trabajos de Sandberg y col. (25). La observación de Eisenstein y col. (71), 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 (69). Scheld y col. (72), 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.

5.3.2. 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 (6).

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 (73).

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 col. (74), 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 (75). Otras propiedades de superficie fisicoquímicas, tales como carga, están también implicadas en la unión (76). La hidrofobicidad y superficie bacteriana es importante para la adhesión de la bacteria a substratos insolubles en agua (5). 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 (77). Son muchos los estudios existentes sobre la contribución de la hidrofobicidad de superficie a la adhesión bacteriana; sobre este aspecto los gémenes más estudiados son *Salmonella* (75), *Echerichia coli* (78), *N. gonorrhoeae* (79), y *Streptococcus* (80). En el caso del gonococo su superficie celular presenta una membrana externa similar en su composición básica a las otras membranas de gémenes 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 (45), 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 fisicoquímicas de estas estructuras de superficie en *Salmonella tiphimurium* y *Serratia marcescens* han sido extensamente analizadas por Hemansson y col. (81), demostrando 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 oligosacáridicos), 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 (75). 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 (82).

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 fisicoquímicas 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 (83), 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 fisicoquímicas 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 (70). 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. *Escherichia coli*. Características del microorganismo.

Es un bacilo gramnegativo, móvil que pertenece al género *Escherichia* y a la familia *Enterobacteriaceae*, y por tanto, aerobio y anaerobio facultativo, fermenta la glucosa con producción de gas y ácidos diversos, y es oxidasa negativo. Son bacilos poco exigentes en cuanto a sus necesidades nutritivas y resisten relativamente a los agentes externos, cultivándose en medios comunes, incluso a T^a de 45 °C. Constituye la mayor parte de la flora comensal aerobia y anaerobia facultativa del tubo digestivo, colonizándolo a las pocas horas o días del nacimiento, a partir del agua o del alimento ingerido, o directamente desde otros individuos (84) y se elimina por las heces al exterior.

Estructura antigénica.

Presentan antígenos somáticos (O), capsulares (K), flagelares (H) y en las fimbrias (F). En la actualidad se conocen 167 antígenos O, 103 antígenos K, 75 antígenos H y aproximadamente 12 antígenos F, que han hecho posible una clasificación de *Escherichia coli* en grupos O y serotipos, algunos de los cuales están asociados a cuadros patológicos.

El antígeno O se encuentra en el lipopolisacárido situado en la membrana externa de la pared. Estos LPS poseen estructuralmente tres zonas, la más interna es el lípido A, en la zona media se halla un número limitado de azúcares (5 a 7) y en la externa una larga cadena de azúcares, que constituye el antígeno O (85). El antígeno H está constituido por flagelos, formados por subunidades proteicas (flagelina) altamente antigénicas. El antígeno K está constituido por cantidades variables de polisacárido capsular inmunógeno.

Acción patógena.

A) Determinantes del poder patógeno:

- Antígenos. Es conocida la capacidad de adherencia de las fimbrias, distinguiéndose las fimbrias tipo 1 o manosa-sensibles (MS) que se encuentran en la mayoría de *Escherichia coli* y se aíslan de heces normales (70-80%). Actúan facilitando la adherencia al moco del intestino grueso y al moco urinario. Las fimbrias manosa-resistentes (MR), denominadas también factores de colonización (CFAI, CFAII y E8775), facilitan la fijación en receptores específicos de las células de la mucosa intestinal (86). Además, los antígenos O y K tienen propiedades antifagocitarias e inhibitoras de las sustancias bactericidas del suero y de ellas depende la virulencia de las cepas invasivas cuya síntesis está codificada por plásmidos de elevado peso molecular (140 Mdaltons).
- Toxinas. El lípido A es una endotoxina ligada al lipopolisacárido, responsable de la acción pirógena y probablemente de las alteraciones vasculares que suceden en las infecciones generalizadas. La producción de diarreas es debida a exotoxinas, cuya síntesis está codificada por la presencia de plásmidos, que a su vez pueden contener genes asociados con la capacidad de adherencia y otras propiedades (producción de colicinas, hemolisinas y resistencia a los antibióticos). Se conoce la existencia de una enterotoxina termolábil (TL) y antigénica semejante a la enterotoxina de

Vibrio cholerae, que actúa activando la adenilciclase, la cual a su vez transforma el ATP en AMP cíclico, produciendo un aumento de la secreción de agua y electrolitos (86). Además hay una toxina termoestable (TS) y no antigénica que también da lugar al acúmulo de líquidos en el intestino por otro mecanismo (probablemente por la vía de la guanilciclase) (86). La *Escherichia coli enterotoxígena* produce alteraciones de tipo funcional a través de estas toxinas. El serotipo O 157 produce una enterotoxina citotóxica (Verotoxina) que actúa sobre las células endoteliales de los vasos produciendo diarreas hemorrágicas. Algunas cepas de *Escherichia coli* poseen una capacidad de penetrar e invadir las células del epitelio intestinal (*Escherichia coli enteroinvasivas*) y ello es debido a la presencia de antígenos superficiales, especialmente, proteínas de la membrana externa, cuya síntesis está codificada por plásmidos de 140 Mdaltos.

- Fermentos. Algunas cepas de *Escherichia coli* son hemolíticas y se han descrito dos hemolisinas, una asociada al soma bacteriano y otra difusible, cuya importancia como determinantes de la patogenicidad no se conoce (86)

B) Cuadros clínicos.

Escherichia coli puede infectar al intestino de forma primaria produciendo diarrea o bien, como oportunista, dar lugar a cuadros extraintestinales diversos.

Infecciones intestinales con diarrea.

La *Escherichia coli* es el germen más frecuentemente implicado en la diarrea del recién nacido y del adulto, siendo tres los grupos que pueden intervenir:

1. Escherichia coli enteropatógenos.

Se presenta en forma de brotes epidémicos durante los meses de verano, fundamentalmente en lactantes y niños pequeños y son producidos por serotipos pertenecientes a 17 grupos O. Su frecuencia y gravedad ha ido decreciendo en las últimas décadas, detectándose cada vez con más rareza en los países más desarrollados, aunque en otros países sí pueden verse aún casos, incluso graves.

2. Escherichia coli enterotoxigénico.

Son la causa de las gastroenteritis en la infancia en los países en vías de desarrollo. Su frecuencia en países desarrollados es menor. Acontecen en verano y sobre todo en menores de 2 años. Es la responsable de la conocida diarrea del viajero.

Las cepas enterotoxígenas pueden producir los dos tipos de enterotoxinas (TL o TS) o sólo una de ellas, debido a la presencia de plásmidos *Ent*. Estas cepas además, presentan fimbrias con adhesinas MR (denominadas factores de colonización en las cepas humanas), específicas de especie, que facilitan la adherencia. La mayoría de las cepas enterotoxígenas producen ambos tipos de toxina y el 70% presentan fimbrias MR.

La ingesta de una dosis elevada de estos microorganismos (10^7 - 10^9) bien con el agua o bien con los alimentos facilita su adherencia (factor de colonización o fimbrias MR) a las microvellosidades de las células epiteliales del intestino delgado, la toxina producida se fija en el receptor celular estimulando la adenilciclase, que por vía del AMP cíclico produce un aumento de secreción de líquido y electrolitos (cloro y sodio) a la luz intestinal (86). El resultado será un cuadro de diarrea leve, moderada o grave (de

tipo coleriforme). Generalmente este cuadro es de resolución espontánea no precisando tratamiento antibiótico.

3. *Escherichia coli* enterohemorrágico.

El serotipo O 157 H7 es productor de una citotoxina para las células Vero (Verotoxina) que parece semejante a la producida por *S. Dysenteriae*, que tiene acción sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos. La *Escherichia coli* enterohemorrágica se ha asociado al síndrome hemolítico-urémico en los niños.

4. *Escherichia coli* enteroinvasivo.

Estas cepas que se demuestran raramente en los países desarrollados, tienen la capacidad de penetrar e invadir las células del epitelio intestinal, produciendo diarrea de tipo disenteriforme semejante a la producida por *Shigella*. Los serogrupos que con más frecuencia se han aislado son el 124 y 164, los cuales presentan caracteres atípicos (son inmóviles, no fermentan la lactosa o lo hacen muy lentamente y no producen gas ni lisín-descarboxilasa) y antígenos comunes con *Shigella*.

Infecciones extraintestinales.

Escherichia coli puede producir infecciones oportunistas fuera del tubo digestivo siempre que concurren factores predisponentes como: obstrucciones o estasis de vías urinarias o biliares o ante una disminución de los mecanismos de defensa como ocurre en el recién nacido (especialmente en el prematuro), enfermedades crónicas, tumorales, edad avanzada, terapias con corticoides y citostáticos. Especial atención merecen las meningitis y sepsis neonatales, que se presentan en recién nacidos y prematuros en el principio de la vida, producidas con más frecuencia por *Escherichia coli* K1. Entre las patologías más habituales destacan:

- a) Es una de las causas más frecuentes de infección urinaria.
- b) Está implicada en infecciones biliares (colecistitis), peritoneales (peritonitis, abscesos abdominales), y meníngeas (meningitis).
- c) Infección de heridas (abscesos) y mucosas (otitis, sinusitis).
- d) causa procesos generalizados, bacteriemias y sepsis.

Diagnóstico bacteriológico.

El método empleado es el de la tinción de Gram. Se aplica sobre la muestra que se ha recogido previamente, y se observan bacilos gramnegativos. Si la muestra es de heces, eventualmente se observará la existencia de pus (leucocitos polinucleares), indicando la presencia de bacterias invasivas. El cultivo se realiza en placas de agar-sangre o en medios diferenciales poco selectivos (EMB, MacConkey), seleccionando las colonias que fermentan la lactosa para proceder a continuación a su identificación por pruebas metabólicas. Los métodos de tipado serológico que identifican los antígenos O y K se usarán para reconocimiento de las cepas.

Tratamiento.

Las formas benignas de enterocolitis por *Escherichia coli* no requieren tratamiento. Las formas graves por *Escherichia coli* enteroinvasora se pueden beneficiar de la antibioterapia. Ante una infección urinaria es fundamental establecer la sensibilidad del microorganismo, los factores predisponentes y la topografía de la infección (cistitis o pielonefritis). La amoxicilina, el cotrimoxazol, las quinolonas y los aminoglicósidos, cuando son activos *in vitro*, son clínicamente muy eficaces (85).

5.5. *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* (85). 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 (84). Taxonómicamente pertenecen a la familia *Neisseriaceae*, que también incluye los géneros *Moraxella*, *Acinetobacter* y *Kingella* (85). Tiene un tamaño aproximadamente de 0,8 μm y recién aislados del enfermo poseen pili (84). 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. En España, el protagonismo en las infecciones meningocócicas se lo ha llevado el serogrupo B, aunque en la el momento actual estamos asistiendo a un incremento de las infecciones producidas por el serogrupo C, constituyendo ya un 30% del total, frente a un 60% de las originadas por el serogrupo B.

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 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 (85).

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* K₁.

La adherencia a las células epiteliales de la mucosa y endoteliales en el sistema nervioso central está mediado 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 (84).

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 (85).

Patogenia.

Los meningococos de los grupos A, B y C son los más patógenos y los que se aíslan 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 (86). 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 (84). 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 contrainmuno-electroforesis. 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 CO₂.

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 (ONP-) 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 5.2.
N. meningitidis. Composición del polisacárido capsular.

Serogrupos	Composición
A	Fosfato de N-acetil-3-O-acetilmanosamina (α 1-6)
B	Ácido N-acetilneuramínico (α 2-8)
C ⁺	Ácido N-acetil-y-O-acetilneuramínico (α 2-9)
C ⁻	Ácido N-acetil-neuramínico (α 2-9)
D	No se conoce
X	Fosfato de N-acetil-glucosamina (α 1-4), glucosa (α 2-6)
Y	Ácido N-acetil-neuramínico, glucosa (α 2-6)
Z	No se conoce
Z' (29 E)	Ácido 3-deoxi-D-mannooctulosónico N-acetilgalactosamina (β 2-3)
W135	Ácido N-acetil-neuramínico (α 1-4), galactosa (α 2-6)

5.6. 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 (O₂) 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, etc. 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)* (87). 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 (88).

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 5.1), 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 (87).

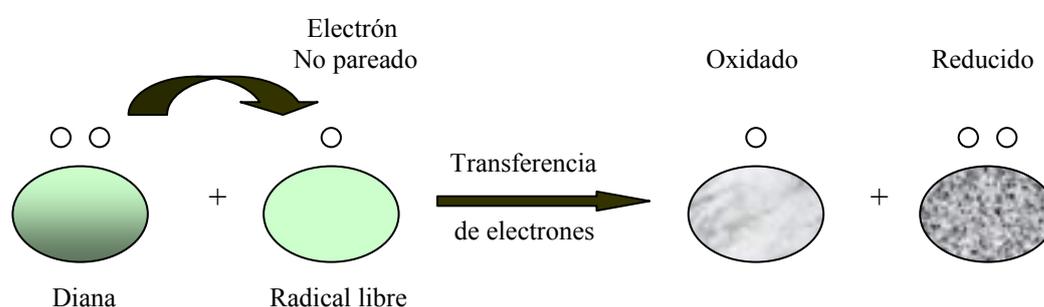


Figura 5.1. Representación esquemática de la reacción de un radical libre con una molécula.

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

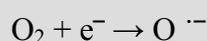
procesos fisiológicos y patológicos y son: anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO \cdot).

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 (89).

Sabiendo que los radicales libres se están formando continuamente es evidente que el organismo debe de 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 (90).

5.6.1. Radical Superóxido ($O_2^{\cdot -}$).

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 (91). 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 (92).

Tabla 5.3.
Algunos radicales libres y su blanco biológico típico.

Radical	Nombre	Vida media	Blanco biológico
$O_2^{\cdot -}$	Superóxido	10^{-5}_s	Enzimas
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno	Estable	Ácidos grasos insaturados
HO \cdot	Radical hidroxil	10^{-9}_s	Todas las moléculas
R \cdot	R-ilo	10^{-8}_s	Oxígeno
RO \cdot	R-oxilo (alcoxilo)	10^{-6}_s	Ácidos grasos insaturados
ROO \cdot	R-dioxilo (peroxilo)	7_s	Ácidos grasos insaturados
ROOH \cdot	Hidroperóxidos		Ácidos grasos insaturados
1O_2	Singlete de oxígeno	10^{-6}_s	H_2O
HOCL	Ácido hipocloroso	Estable	Distintas moléculas
NO \cdot	Radical de óxido nítrico	$\sim 1_s$	Distintas moléculas

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 P₄₅₀ en el retículo endoplasmático hepático, o en la autooxidación de moléculas como hemoproteínas, hidroquinonas, catecolaminas, ascorbato, tioles, etc. (93).

El anión superóxido puede transformarse en radical perhidroxilo (HO₂[·]) 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%) (92).

5.6.2. Peróxido de hidrógeno (H₂O₂).

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 (94); 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) (95). Aunque la reactividad química del anión superóxido es limitada, el H₂O₂ puede atravesar sin dificultad las membranas biológicas, llegando a producir lesiones oxidativas en macromoléculas, distante de su lugar de producción (94). Algunos estudios ponen de manifiesto que la acción citotóxica del H₂O₂ no se produce directamente, sino a través de sustancias de mayor reactividad, originadas a partir del H₂O₂ y otro agente reductor, como el O₂⁻ o un ión metálico como el Fe²⁺.

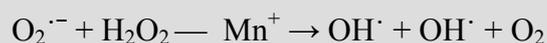
5.6.3. Radical Hidroxilo (OH[·]).

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 O₂⁻ y H₂O₂ 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 (96). Este radical surge de la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de

transición, como el hierro (Fe^{2+}) y el cobre (Cu^{2+}) (97). Cuando es el hierro el que participa en la producción del ($\text{OH}\cdot$), tiene lugar la reacción de Fenton:



La *reacción de Haber-Weiss*, conocida en algunos casos como “*reacción de Fenton conducida por el $\text{O}_2^{\cdot-}$* ” consiste en la producción de hidroxilo, inducida por el anión superóxido (92).



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.

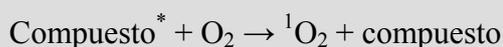
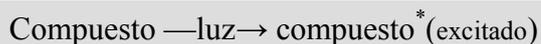


Otras fuentes de producción del radical hidroxilo son:

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

5.6.4. 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 (98). 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 (99).



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, rivoflavinas 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 (100), han encontrado que otra forma de producción de este radical consiste en la interacción del ozono con ciertas moléculas biológicas.

5.7. Fuentes de producción de radicales libres.

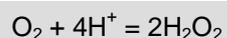
La formación de RL, puede acontecer de forma fisiológica o patológica, utilizando diversos mecanismos (Tabla 5.4).

Tabla 5.4.
Procedencia del estrés oxidativo.

FUENTE	MECANISMO
Transporte mitocondrial De electrones Metales iónicos	Superóxidos por reducción ineficiente de O ₂ Cu ⁺⁺ y Fe ⁺⁺ facilitan radicales hidroxil
Células inflamatorias Enzimas (<i>xantina oxidasa</i>) Drogas (paraquat, Adriamicina, paracetamol)	Radicales libres por fagocitos activados Reperusión de tejidos isquémicos Intermediarios metabólicos
Humo cigarrillos Radiación	Fase gaseosa rica en radicales libres Rayos X, luz ultravioleta

5.7.1. 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 (95), dando lugar a la formación de *anión superóxido*, el cual rápidamente se dismuta (por acción de la *superóxido dismutasa*) a *peróxido de hidrógeno* (101) 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 (102).

-
- Cuando la cadena de transporte de electrones está completamente reducida, como sucede durante los periodos de isquemia y reperfusión (93).

5.7.2. 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 Ca^{2+} citosólico. Esta situación provoca la activación de enzimas dependientes del calcio como las *proteasas* (103). 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 Ca^{2+} intracelular como por la activación de determinadas *proteasas* (104). La xantino-oxidasa puede resultar inhibida por allopurinol o por 2-amino-4-hidroxi-6-formilpteridina (pteridil-aldehído) (90).

5.7.3. Metabolismo del ácido araquidónico.

El ácido araquidónico (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 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 G_2 (PGG_2) que, más tarde y mediante la acción de la prostaglandina H_2 -sintetasa, se convierte en prostaglandina H_2 (PGH_2). Es en esta última etapa y en presencia de NADH o NADPH, donde se puede generar $\text{O}_2^{\cdot -}$ (105). La síntesis de oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$) se lleva a cabo a través de la vía lipooxigenasa (106). Por ambas vías se pueden formar peróxidos intermedios que, junto con los radicales libres, pueden incrementar el daño en situaciones patológicas (107).

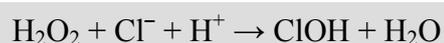
5.7.4. Formación de radicales libres por células fagocíticas.

Las células fagocíticas generan radicales libres, por el solo 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* ($\text{O}_2^{\cdot -}$). 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_{254}*

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 $O_2^{\cdot-}$ derivado de la síntesis de NADPH a partir de hexosas monofosfato (108).



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 ($-SH$) (107). Una deficiencia congénita de esta enzima (*Enfermedad Granulomatosa Crónica*) favorece la aparición de infecciones de repetición.

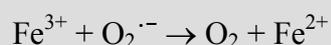


El pH existente en situaciones de inflamación y fagocitosis facilita la liberación de iones metálicos, conduciendo a la formación de radical hidroxilo en los fagolisosomas por la clásica *reacción de Fenton* (109).

El *óxido nítrico* (NO^{\cdot}), radical formado durante la fagocitosis, produce un efecto citotóxico en la defensa contra células tumorales, hongos, parásitos, protozoos, helmintos y micobacterias (110). Este radical libre al reaccionar con el $O_2^{\cdot-}$ produce peroxinitritos que darán lugar por descomposición al OH^{\cdot} . 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.

5.7.5. Metales iónicos y producción de radicales libres.

Algunos radicales libres como el *anión superóxido* ($O_2^{\cdot-}$) 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^{\cdot}) requiriendo para ello la presencia de metales de transición, principalmente hierro (Fe^{2+}) y cobre (Cu^{2+}) (111). La generación de OH^{\cdot} 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 (Fe^{3+}), que no es reactivo con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), a ferroso (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.

5.7.6. Citocromo P₄₅₀.

El sistema NADPH/NADPH citocromo P₄₅₀ reductasa/citocromo P₄₅₀ puede reducir compuestos generando radicales libres. Un ejemplo de este proceso es la eliminación de alcoholes como el etanol por el citocromo P₄₅₀ dando lugar a la formación de hidroxietileno a nivel hepático (112).

5.7.7. 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 *tripleto excitado*, que ya es un radical libre.

5.8. 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% (99).

En la figura 5.2. queda reflejada la complejidad de las vías por las cuales el estrés oxidativo provoca toxicidad y muerte celular. 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 (99).

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 (104).

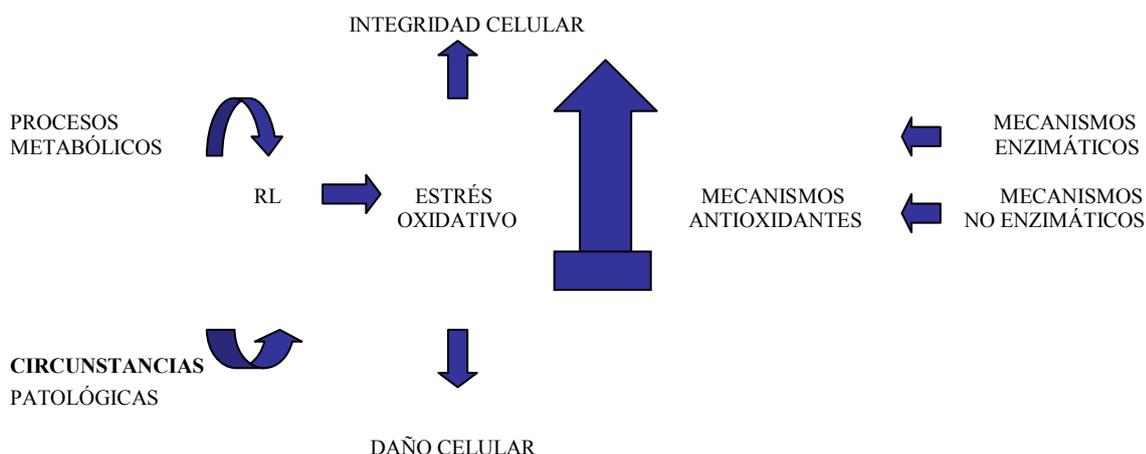


Figura 5.2. Representación esquemática de la dualidad estrés oxidativo- sistemas antioxidantes.

5.9. Interacciones entre radicales libres e hidratos de carbono.

Algunos azúcares, como la glucosa y el manitol, reaccionan con el OH^\cdot 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 $O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 \rightarrow OH^{\cdot}$ 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 $O_2^{\cdot-}$ en un proceso catalizado por metales de transición (113). 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 (97).

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. (114).

5.10. 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 (115). Los radicales libres del oxígeno (en particular el OH^{\cdot}) 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^{\cdot} , solo o en presencia de H_2O_2 , 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_2O_2) y del *anión superóxido* ($O_2^{\cdot-}$) en presencia de metales de transición, formándose como consecuencia *radical hidroxilo*. El daño indirecto sobre el DNA también puede ser mediado por *endonucleasas calciodependientes* (115). 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*”.

5.11. 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* (116), 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 (117).

5.12. 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 (118). 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^{\cdot} , endoperóxidos e hidroperóxidos (119).

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 (120).

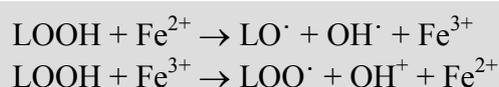
Entre los productos finales de la peroxidación lipídica se encuentran los hidroperóxidos de ácidos grasos, metabolitos como los *aldehídos malondialdehído* (MAD) y *4-hidroxinonenal*, e hidrocarburos de cadena intermedia como el *pentano o el etano*.

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 (99). Estos radicales centrados en el carbono reaccionan seguidamente con el oxígeno produciendo el radical lipídico peroxilo (LOO^{\cdot}), el cual puede reaccionar con otros ácidos grasos comenzando una nueva cadena de oxidación y la formación de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) (120). 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 (120). Los metales iónicos de transición, como el hierro se consideran como los

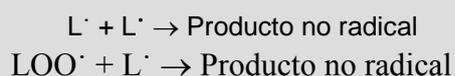
auténticos iniciadores de la peroxidación lipídica ya que parecen estar implicados en la génesis de este proceso.

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 (99). 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 terminar 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 (120). 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 (121), 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 (122). Tanto la peroxidación lipídica como la fluidez de membrana se han implicado en procesos patológicos y patofisiológicos (104;123). 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 (124).

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 (120).

5.13. 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-peroxidica*, 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 (125), como el H_2O_2 y los *hidroperóxidos alquilo*.

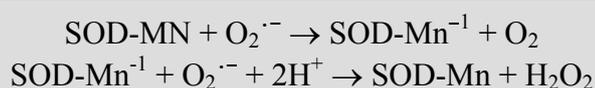


El predominio de una u otra reacción está en función de la concentración de donadores de hidrógeno y de la concentración o producción de H_2O_2 en el sistema (125). Entre las investigaciones realizadas a este respecto en el campo de la microbiología cabe destacar el estudio llevado a cabo por Archibald, F.S. y col. (126), 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 $O_2^{\cdot-}$ en los compartimentos celulares (127), ya que acelera la dismutación espontánea de $O_2^{\cdot-}$ hacia H_2O_2 y O_2 .



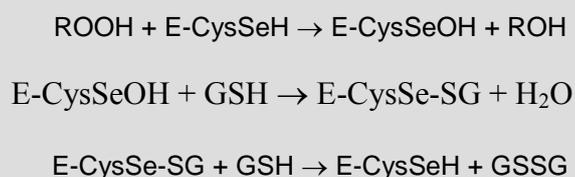
Según su localización en la célula y los metales que contienen, se pueden diferenciar tres grandes familias de SOD: las *superóxido dismutasas-cobre/cinc-dependientes* o citoplásmicas (Cu, Zn-SOD) y las *manganeso-dependientes* o mitocondriales (Mn-SOD) cuya localización es intracelular, y una intracelular (Esc-SOD) (127). 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 (128). 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 *glutation disulfato oxidado* (GSSG), reacción esencial para mantener los niveles de *glutation reducido* (GSH).



La presencia de GSH es clave en los procesos de óxido-reducción, actuando asimismo en los procesos de detoxificación y en otras funciones celulares de gran importancia (129). La actividad enzimática de la glutathion 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 tiazolidincarboxilo, 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 α -tocoferol, al cual se le considera como el antioxidante soluble en lípidos más efectivo de la naturaleza (130).

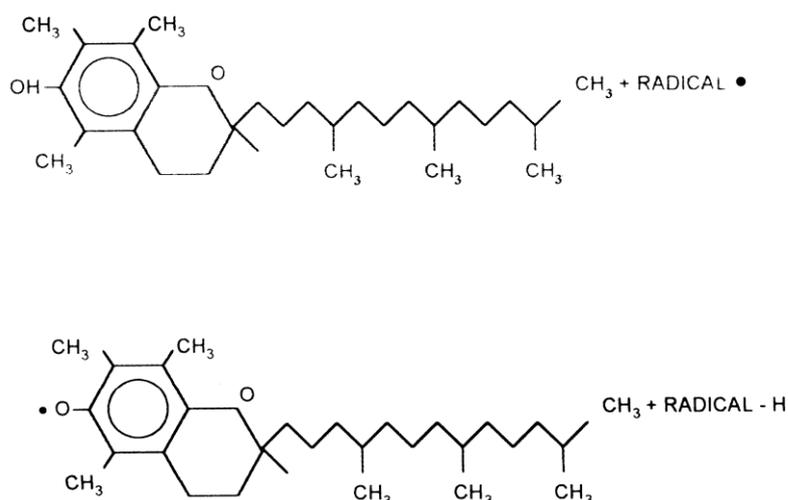


Figura 5.3. Esquema de la estructura de la vitamina E (imagen superior) y del radical fenoxilo (imagen inferior) formado tras la neutralización de un radical libre.

El resultado biológico de la reacción presentada en la figura 5.3. 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 mas importante no es único, habiéndose descrito su efecto como eliminador de otros radicales como azida, 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 5.3) (131). Aunque es sintetizada por un gran número de células y tejidos (132), su síntesis en los mamíferos se lleva a cabo fundamentalmente en la *glándula pineal* (133). 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 (134), 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 (135). 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* (136), el *sistema nervioso* (137), la capacidad de *crecimiento tumoral* (138) y se ha demostrado un efecto protector del daño sobre el DNA inducido por carcinógenos químicos (139); funciones todas ellas que se relacionarían con los primeros hallazgos sobre la potencial influencia de la melatonina sobre cualquier célula del organismo (140). Tanto 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 (141). Estos radicales originan el estrés oxidativo, pudiendo desembocar en la degeneración y muerte celular como ya se vió anteriormente.

El radical hidroxilo (HO^\cdot) es uno de los mediadores mayormente involucrados en la toxicidad debido al oxígeno en los organismos (142), 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^\cdot), 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 (143), 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 (144). En esta función de limpieza de radicales libres puede actuar sinérgicamente con otros antioxidantes conocidos, como las vitaminas C y E (145). La acción antioxidante de la melatonina incluye además, el efecto estimulante ejercido sobre las enzimas antioxidativas superóxido dismutasa (SOD) (131) y glutathion peroxidasa (GPX) (146). 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.

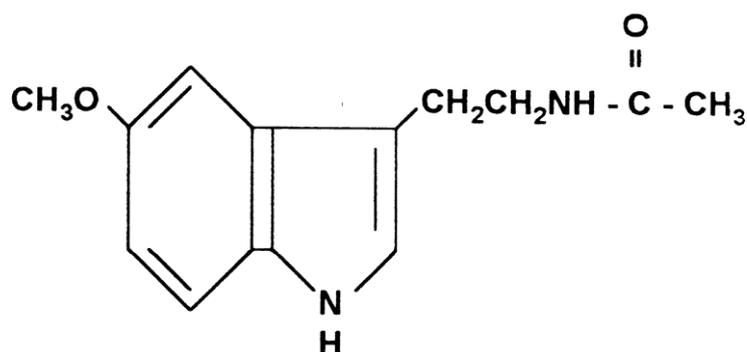


Figura 5.4. Melatonina.

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 (147). 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 (140).

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 (135). 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 (148).

c) *Ascorbato*: La información sobre la vitamina C, de hecho bioquímicamente podría funcionar como un prooxidante y hay quien sugiere que la presencia de tocoferol en las membranas biológicas es precisa para evitar este punto; sugiriéndose que en ausencia de vitamina E el ascorbato induciría peroxidación (149).

d) *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 (149).

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

5. Justificación y objetivos

La investigación de los efectos de los radicales libres sobre múltiples patologías y el potencial efecto beneficioso de diversas sustancias antioxidantes ha sido un hecho trascendente en la investigación de la última década (150;151). En este periodo hemos podido asistir a la utilización rutinaria del concepto de moléculas antioxidantes o la terminología anglosajona “scavenger” en el campo de la neurología (152), inmunología (148), endocrinología (153) y oncología (154) por citar algunos ejemplos. Sin embargo, y pese al antiguo conocimiento de la utilización de mecanismos de oxidoreducción por parte del sistema mononuclearfagocítico para la limitación de procesos infecciosos en el organismo, son pocos los estudios que han relacionado potencial redox del entorno bacteriano y viabilidad o patogenicidad del microorganismo.

Conscientes de que muchos de los cambios en la patogenicidad bacteriana son inherentes tanto al microorganismo como a modificaciones en el medio interno del huésped, hemos desarrollado la siguiente hipótesis de trabajo que justifica el desarrollo del presente proyecto de tesis doctoral:

- La hidrofobicidad y las características de superficie de los microorganismos han sido implicadas en la colonización de los epitelios de mamíferos y en su mayor o menor tendencia a la fagocitosis; por tanto, en su capacidad para producir enfermedad.
- Durante los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento del papel inmunomodulador de la melatonina (155), su participación en los procesos de estabilización del estrés oxidativo mediante la neutralización de radicales libres (132) y estabilización de las membranas celulares (133).
- El estímulo en la síntesis de catalasa y superóxido dimutasa cuando algunas bacterias son preincubadas en presencia de concentraciones subinhibitorias de O_2^- y H_2O_2 , indican que los cambios en las características de superficie de la bacteria son respuestas concretas a modificaciones puntuales en el entorno redox del microorganismo.
- Por otro lado, las modificaciones rítmicas en la secreción de melatonina por parte de la glándula pineal puede ser punto de partida para explicar la diferente susceptibilidad individual del huésped a las infecciones.

Todos estos planteamientos vienen animados por la idea de que un mejor conocimiento de la respuesta del microorganismo bacteriano a las modificaciones del medio interno y potencial redox del huésped pueden ayudar a comprender el diferente potencial patogénico de un microorganismo en diversas situaciones. Consideramos que

un alto porcentaje de pacientes con enfermedad meningocócica invasiva podrían sufrir modificaciones en el estado oxidativo del medio interno que de alguna forma repercuten en las características adherentes y patogénicas del microorganismo.

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:

- Determinar el porcentaje de adhesión de *Escherichia coli* a la nitrocelulosa, así como las características hidrofóbicas de superficie de las cepas seleccionadas
- Determinar el porcentaje de adhesión a la nitrocelulosa, así como las características hidrofóbicas de superficie de cepas seleccionadas de *Neisseria meningitidis*.
- Describir las modificaciones de las características de superficie antes citadas de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* en presencia de concentraciones crecientes de melatonina.
- Analizar la repercusión de la vitamina E sobre las características de superficie de cepas escogidas de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.
- Establecer las diferencias fundamentales en lo referente al comportamiento hidrofóbico y adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.
- Evaluar la importancia de la síntesis proteica *de novo* sobre las modificaciones inducidas por la melatonina en las características de superficie de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.
- Finalmente, mediante la aplicación de técnicas estadísticas adecuadas, describir, de entre las modificaciones experimentadas por las diferentes cepas, qué importancia tiene el mayor o menor contenido en hierro del medio de cultivo.

En el desarrollo de nuestro estudio hemos seguido el planteamiento que esquemáticamente se describe en la figura siguiente; como puede apreciarse hemos analizado 6 cepas de *Neisseria meningitidis* y 23 cepas de *Escherichia coli*, según se describe en el apartado de Material.

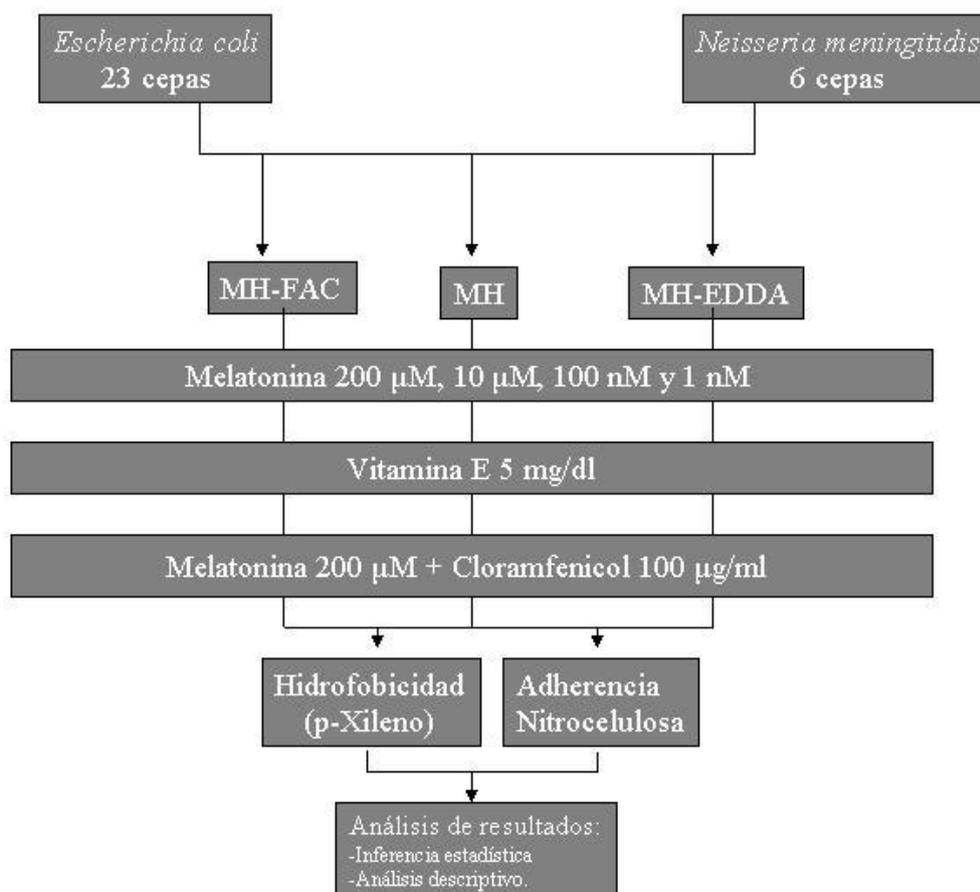


Figura 6.1. Esquema del diseño experimental del presente trabajo de tesis doctoral.

MATERIAL Y MÉTODO

7. Material y método

7.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

7.1.1. *Neisseria meningitidis*.

Se estudian 6 cepas de *Neisseria meningitidis*, dos de ellas aisladas de la nasofaringe de portadores sanos (P391 –ungroupable, autoagglutinable, serotype 15- and P000 –serogrupo B, serotipo 15-); y 4 cepas (V002 –serogrupo B, serotipo 15-, V021 –serogrupo B, no serotipable-, V019 -serogrupo B, serotipo 1-, V111 –serogrupo C-) aisladas desde líquido cefalorraquídeo o sangre de pacientes con enfermedad meningocócica invasiva; las cepas numeradas P000, P391, V019, V002 y V021 fueron cedidas por los Dres. C. Ferreirós y M^a T. Criado del Departamento de Microbiología de la Universidad de Santiago; la cepa V111 fue aislada en el Departamento de Microbiología del Hospital Clínico –San Cecilio”. Las cepas fueron mantenidas hasta su utilización congeladas a –30°C y recuperadas por aislamiento en placas de agar sangre.

7.1.2. *Escherichia coli*.

Se estudian 12 cepas aisladas en pacientes con infección urinaria sintomática (fiebre y leucocituria de más 50 células/campo), la numeración de estas cepas y sus características se muestran en la Tabla 7.1. Las restantes cepas de *Escherichia coli* que se muestran en la Tabla 7.2 fueron cedidas por la Colección Nacional de Cultivos Tipo (Valencia).

7.1.3. Conservación de las cepas y utilización.

Se inocula con un asa de siembra en un tubo con 5 ml de medio Müeller-Hinton y se incuba a 37°C durante 24 horas. Se centrifuga a 3500 rpm durante 10 minutos y se retira el sobrenadante con una pipeta Pasteur de vidrio estéril, se resuspende en medio de cultivo Müeller-Hinton con glicerol al 20% y seroalbúmina bovina (v/v) al 5%. Se traslada la suspensión a un vial de polipropileno estéril de 2 ml y se almacena a -30°C.

Para su utilización posterior los viales de polipropileno se depositan unos 15 minutos a temperatura ambiente, con un asa de siembra se inoculan tubos con 4 ml de medio de cultivo Müeller-Hinton y se incuban a 37°C durante 24 horas, posteriormente se siembra en placa de Müeller-Hinton por aislamiento y se incuba a 37°C durante 24 horas.

Tabla 7.1
Características de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de sujetos con patología urinaria aguda.

<i>Escherichia coli</i>	Características
629	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN-, PLI-, LAC+, SUC-, RHA-, OXI-
695	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR-, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
787	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN-, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-
472	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
471	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
792	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL- XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
697	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL-, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
595	DP3-, URE+, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-
753	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-
795	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF-, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
760	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC+, RHA+, OXI-
469	DP3-, URE-, MLT+, INO-, ARA+, OFG+, CIT-, MAN+, ADO-, GLU+, GC+, MAL-, XYL+, COU+, ARG-, ACE-, TDA-, RAF+, H2S-, LYS+, ESC-, PXB-, SOR+, ONP+, ORN+, PLI-, LAC+, SUC-, RHA+, OXI-

Tabla 7.2
Características de las cepas de *Escherichia coli* de la Colección nacional de Cultivos Tipo (CECT) incluidas en el estudio.

<i>Escherichia coli</i> (CECT)	Características
434	Cepa modificada para ensayos de sensibilidad a cefalosporinas.
515	Serovar. O1: K1(L1):H7. Indol+, acetona+, catalasa+, oxidasa-.
516	Reduce ácido dehidroascórbico.
685	Serovar. O25: H42. Met.: toxina termolábil (LT +), toxina termoestable (ST +).
4076	Serovar. O157:H7. Aislada originariamente de colitis hemorrágica.
418	F lacY1 glnV44(AS) galT22 galK2(Oc) LAM ⁻ tyrT58(AS) metB1 hsdR514 trpR55.
743	Serovar. O142 K86B:H6. Aislada de niños con diarrea.
100	Mutante resistente a la radiación. UV:R, X-ray:R.
727	Serovar. O111: K58(B4):H-. Cepa enteropatógena.
417	SupE44(am). TRNA mutante.
424	F ⁻ thr ⁻ leu ⁻ lacY mtl ⁻ thi ⁻ ara gal ton 2 malA xyl. Resistente a fagos T ₁ , T ₂ y T ₆ .

7.1.4. Caracterización de las cepas.

En las cepas de *Escherichia coli* se determinó la utilización de lactosa, para ello se siembran por aislamiento en una placa de Petri con agar McKonkey, se incuba a 37°C durante 24 horas, se determina la utilización de lactosa en función del color de las colonias, colonias de color rojo (lac+) indica utilización de lactosa; las colonias de color amarillo (lac-) indica no utilización de lactosa.

7.1.5. Condiciones de cultivo.

Para cada experimento tanto *Escherichia coli* como *Neisseria meningitidis* fueron inoculados en tubos conteniendo 4 ml de Müeller-Hinton caldo (Fluka) (MH), se incubaron a 37°C durante 24 horas antes de su procesamiento. El contenido en hierro del medio de cultivo se modificó añadiendo 39 µMol de ácido etilen-diamino-dihidroxifenil-acético (Sigma) a 100 ml de Müeller-Hinton caldo (EDDA-MH, restricción de hierro) o con citrato amónico-ferroso (Sigma) (1 µg Fe/ml) (FAC-MH, exceso de hierro), según los siguientes puntos:

- Se prepara medio de cultivo Mueller-Hinton (MH) caldo a partir de medio seco deshidratado (Sigma, Chem, Co.) y se añade a los tubos para inóculos 4 ml de medio de Müeller-Hinton (MH), Müeller-Hinton con restricción de hierro (EDDA-MH) y Müeller-Hinton con exceso de hierro (FAC-MH).

-
- MH: Se prepara a partir del medio Müller Hinton deshidratado (Sigma, Chem, Co.) añadiendo a 30 g del medio seco 1 l. de agua destilada, se preparan tubos de vidrio con tapón de rosca con 4 ml de medio de cultivo y esterilizamos 15 minutos en autoclave.
 - MH-EDDA: Se prepara a partir del medio MH deshidratado (Sigma, Chem, Co.) añadiendo a 30 g del medio seco 1 l. de agua destilada, esterilizamos 15 minutos en autoclave y se añaden 39 μMol de ácido etilen-diamino-dihidroxifenil-acético (Sigma) a 100 ml de Müller-Hinton caldo.
 - MH-Fe: Se prepara a partir del medio Müller Hinton deshidratado (Sigma, Chem, Co.) añadiendo a 30 g del medio seco 1 l. de agua destilada, se esteriliza 15 minutos en autoclave y se añade 1 $\mu\text{g/ml}$ de citrato amónico-ferroso al medio Müller Hinton.

7.1.6. Incubación con melatonina.

Durante cada ensayo se preparan disoluciones de melatonina en agua destilada, como el peso molecular de la melatonina es de 232.3 daltons la disolución 1mM se prepara pesando 23 mg de melatonina y añadiéndolos a 100 ml de agua destilada estéril; la disolución 50 μM se prepara tomando 5 ml de la disolución 1mMol y añadiéndolos a 95 ml de agua destilada estéril; la disolución 500 nM se prepara tomando 10 ml de la disolución anterior y los añadimos a 90 ml de agua destilada estéril y la disolución 5 nM se prepara tomando 1 ml de la disolución anterior y añadiéndoselos a 99 ml de agua destilada estéril.

La melatonina se añade en condiciones de máxima asepsia, tras 12 horas de incubación de las bacterias en tubos con 4 ml de medio MH, EDDA-MH y FAC-MH, se añade 1 ml de melatonina en sus disoluciones 1 mMol, 50 μM , 500 nM y 5 nMol a cada uno de los tubos; la concentración final de melatonina en cada tubo será de 200 μM , 10 μM , 100 nM y 1 nM.. Posteriormente se incuba a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta completar 24 horas de incubación.

7.1.7. Incubación con vitamina E.

En condiciones de máxima asepsia diluir la presentación de alfa-tocoferol fosfato sal disódica (Sigma) 250 mg en 50 ml de agua destilada y preparar alícuotas de 2.5 ml que se mantienen congeladas a -30°C hasta su utilización.

Los microorganismos se incuban a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 12 horas (fase de crecimiento logarítmico) en tubos con 4 ml de medio MH, EDDA-MH y FAC-MH y se añaden 40 μl de la dilución de vitamina E, obteniéndose una concentración de vitamina E en el medio de cultivo de 5 mg/dl. Se incuban a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta completar 24 horas de incubación momento en que se procesan para su medida.

7.1.8. Incubación con cloranfenicol a dosis subletales.

El cloranfenicol a dosis subletales (100 $\mu\text{g/ml}$) inhibe la síntesis proteica del microorganismo (156;157). Unos 30 minutos antes de cada ensayo se preparan disoluciones de cloranfenicol en agua destilada de la siguiente forma: 1 g de cloranfenicol succinato sódico se diluye en 10 ml de agua destilada, de esta disolución

se toman 0.1 ml que se añaden a 9 ml de agua destilada (1 mg/ml). El cloranfenicol así diluido en condiciones de máxima asepsia, tras 12 horas de incubación de las bacterias en tubos con 4 ml de medio MH, EDDA-MH y FAC-MH, se añaden 400 μ l de la disolución de cloranfenicol (obteniéndose una concentración final en el medio de cultivo de 100 μ g/ml) y 1 ml de las diluciones de melatonina descritas en el punto anterior, posteriormente se incuba a $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ hasta completar 24 horas de incubación.

7.2. Medida de la hidrofobicidad de superficie.

La hidrofobicidad de superficie se determinó según técnica descrita por Rosenberg (158;159) que resumidamente consiste en preparar un inóculo de la cepa a estudiar en 4 ml de MH, EDDA-MH o FAC-MH, se incuba a 37°C durante 24 horas y se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos, se retira el sobrenadante y se lava con tampón-fosfato (PBS), 0.01 M, (pH 7), se resuspende en 0.4 ml de tampón-PUM (pH 7.1) y añadimos 0.8 ml de sulfato amónico 0.2 M. (ajustar la suspensión a una absorbancia aproximada de 0.6 midiendo con espectrofotómetro a 550 nm). Medimos y anotamos absorbancia inicial (Abs_1), añadimos a 1.2 ml de la suspensión de bacterias 200 μ l de p-xileno (Sigma) y agitamos durante 2 minutos de forma que se homogeneicen la suspensión y el hidrocarburo. Esperamos 30 minutos a que la fase acuosa se separe completamente del hidrocarburo, se retira 1 ml de la fase acuosa y se mide la absorbancia (Abs_2) en un espectrofotómetro a 550 nm y 37°C . La hidrofobicidad se calcula de acuerdo a la fórmula $1-(\text{Abs}_2/\text{Abs}_1)$.

7.3. Adherencia a filtros de nitrocelulosa.

Se realiza el procedimiento descrito por Lachica y Zink (160). De forma resumida, una suspensión de bacterias en buffer PUM y sulfato amónico (1:2, v/v) se ajusta previamente a una absorbancia aproximada de 0.6, midiendo a 540 nm; se determina la absorbancia inicial (Abs_1), se hacen pasar 3 ml de esta suspensión a través de un filtro de nitrocelulosa de 8 μ m de poro (Millipore). Posteriormente se determina la absorbancia del filtrado (Abs_2) y los resultados se expresan como porcentaje de adherencia al filtro de nitrocelulosa.

7.4. Preparación de Búferes.

PBS (Solución 10X) Para su uso diluir 1:10.

Fosfato monosódico (1 H ₂ O):	2.56 g.
Fosfato disódico	11.93 g.
Cloruro sódico	87.66 g.
Azida sódica	1 g.
Agua destilada	Hasta 1 litro.

Tampón-PUM

Fosfato monopotásico (PO ₄ H ₂ K)	7.26 g.
Fosfato bipotásico (PO ₄ HK ₂ 3H ₂ O)	22.20 g.

Urea	1.80 g
Sulfato magnésico (SO ₄ Mg 7 H ₂ O)	0.2 g
Agua destilada	Hasta 1 litro.
Ajustar el pH a 7.1	

Solución de sulfato amónico a concentraciones de 0 a 4 M, utilizando como diluyente solución de fosfato sódico 0.002 M.

7.5. Investigación documental.

El objetivo fundamental de este capítulo se centra en la búsqueda de las fuentes de documentación, de las referencias bibliográficas correspondientes al tema de trabajo. El sistema utilizado pasa por la elaboración de las palabras clave del proyecto "*Neisseria meningitidis*", "*Escherichia coli*", "Hidrofobicidad", "adherencia bacterina", "Melatonina", "Virulencia bacterina" –Adhesinas". Los pasos seguidos en la investigación experimental fueron los siguientes:

- Determinación genérica del área a investigar: Se llevó a cabo una primera consulta a las enciclopedias, diccionarios, tratados, manuales y textos en la parte referente a las materias que en un principio motivaron el tema de la presente Tesis Doctoral.

- Inicio de la formación bibliográfica: El proceso de consulta se va completando con la toma de notas y referencias que finalmente constituirán la bibliografía de la tesis.

- Considerar la actualidad e interés del tema objeto de la investigación. Para lo que se seleccionaron el material documental, las líneas de investigación y los autores que más investigan y publican sobre los temas de interés.

- Superado el punto anterior, y en la nueva línea, se establecieron unos objetivos concretos como hipótesis de trabajo.

- Consulta de las fuentes documentales en relación a los objetivos concretos elegidos. Determinando las fuentes primarias en la literatura organizada (monografías y tratados) y no organizada (revistas, etc.), en las que encontramos la información necesaria, para lo que fue necesario revisar los siguientes repertorios médicos: "MEDLINE", "INDEX MEDICUS", "CURRENT CONTENT", "EXCERPTA MEDICA", "INDICE MEDICO ESPAÑOL". Revisión de la bibliografía actualizada de las palabras clave enumeradas en la base de datos de Internet Grateful Medicine (<http://igm.nlm.nih.gov/>).

- Consulta de los catálogos y ficheros de los Centros de Documentación existentes en Granada. Utilizando para ello la lista de palabras clave formada previamente, según se ha explicado.

El grupo de Vancouver, ha pasado a convertirse en el Comité Internacional de Editores de Revistas Médicas. Son más de 150, las revistas que han acordado que los trabajos se remitan según las normas y estilo de "Vancouver", que textualmente en el capítulo de referencias bibliográficas dice: "Las referencias se han de enumerar siguiendo el orden en que son mencionadas por primera vez en el texto. Señalar las citas en el texto, las tablas y los pies de las figuras, por medio de numeración árabe, entre

paréntesis. Las referencias que son citadas sólo en las tablas o en los pies de las figuras, se numeran de acuerdo con el orden correspondiente al referido en el texto por primera vez a la tabla o las figuras. Utilizar el modo de citar en que se basa la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos empleada en el Index Medicus. Los títulos de las revistas han de abreviarse según el estilo empleado en el Index Medicus para lo que se consultó en el "LIST OF JOURNAL INDEXED" que aparece cada año en el número de Enero del Index Medicus."

Así mismo, el resto de las recomendaciones en la confección de tablas y ficheros fueron tomadas en consideración, de las cuales queremos resaltar el siguiente texto: "Las figuras deberán ser de calidad profesional, tanto los dibujos como las reproducciones fotográficas, considerándose inaceptable marcarlas con letras hechas a mano o con máquina de escribir."

7.6. Método estadístico.

7.6.1. Estadística descriptiva.

Medidas de centralización.

Se llaman medidas de centralización a aquellos valores que tienden a situarse en el centro del conjunto de datos ordenados respecto a su magnitud. En nuestro estudio hemos considerado la media aritmética y la mediana como a continuación detallamos:

- Media aritmética: Se trata de una medida de centralización de tamaño. La media aritmética, de un conjunto de números: x_1, x_2, \dots, x_n , que se presentan con frecuencias absolutas f_1, f_2, \dots, f_n respectivamente es:

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

- 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 número de datos es impar la mediana viene dada por el valor medio de la distribución, si el número de datos es par, la mediana viene dada por la media aritmética de los valores medios.

$$M = L_i + \left(\frac{\frac{N}{2} - (\sum f)_1}{f_{mediana}} \right),$$

donde L_i es el límite inferior real de la clase mediana, N es el número total de datos, $(\sum f)_1$ es la suma de las frecuencias absolutas de todas las clases anteriores a la clase mediana, $f_{mediana}$ es la frecuencia absoluta de la clase mediana.

Medidas de dispersión.

En ocasiones el conocimiento de los valores centrales no es suficiente, y es preciso conocer en que medida los datos numéricos están agrupados o no, alrededor de

la media. Este hecho se conoce como *dispersión*. En nuestro estudio hemos utilizado las siguientes medidas de dispersión:

- *Desviación típica*. Se conoce también como desviación estándar o desviación cuadrática de la media. Se define la desviación típica como la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media. Es decir:

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

- *Varianza*. Se define como el cuadrado de la desviación típica. Es decir:

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

- *Coficiente de variación*. Es el cociente entre la desviación típica y la media aritmética. Es decir:

$$CV = \frac{s}{\bar{x}}$$

El coeficiente de variación tiene escasa utilidad cuando la media se aproxima a cero, ya que entonces toma valores infinitamente grandes.

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.

- *Sesgo, asimetría y curtosis*. Se denomina sesgo a la mayor o menor asimetría o simetría 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.

7.6.2. Inferencia estadística.

Test de Wilcoxon.

La realización de un test de Barlett para la comparación de varias varianzas, la existencia de varianzas distintas y el escaso número de casos incluido en alguno de los grupos, obligan a la realización de test no paramétricos, que al no depender de la

distribución de la variable, no precisan la condición previa de normalidad de las poblaciones.

El test de Wilcoxon permite comparar un conjunto de muestras dependientes desde la visión de los análisis no paramétricos que utilizan series ordenadas de valores de menor a mayor. Se inicia el test con una ordenación de menor a mayor de todos los valores observados en las k muestras y su correspondiente asignación de rangos. El siguiente paso consiste en obtener la diferencia entre cada valor y su correspondiente mediana; posteriormente se suman los rangos positivos (T_+) y los rangos negativos (T_-). La suma de los rangos positivos y negativos es un valor constante:

$$T_+ + T_- = \frac{n(n+1)}{2}$$

Para obtener los valores estandarizados de T_+ y T_- , restamos la media y dividimos por la desviación estándar:

$$\sqrt{\frac{n(n+1)(2n+1)}{24}}$$

Los valores de p en la cola por la derecha (R) para la diferencia de rango positivos y negativos sería:

$$Z_{+R} = \frac{T_+ - 0.5 - n(n+1)/4}{\sqrt{n(n+1)(2n+1)/24}};$$

$$Z_{-R} = \frac{T_- - 0.5 - n(n+1)/4}{\sqrt{n(n+1)(2n+1)/24}};$$

Test de Friedman.

El test de Friedman es un test no paramétrico utilizado para comparar tres o más grupos relacionados. Se trata en realidad de una generalización del test de los signos de Wilcoxon. Como en los otros análisis no paramétricos el primer paso a seguir consiste en asignar un número de orden a cada valor, siempre de menor a mayor; cada grupo o columna (k) es reenumerado separadamente y posteriormente se procede al cálculo de la suma de rangos de cada grupo (R_{ct}). Si la suma de los rangos de cada grupo es muy diferente, el valor de p será muy pequeño y en consecuencia encontraremos diferencias estadísticas significativas entre los grupos. Se calcula la suma de cuadrados de las columnas (grupos). Los casos se disponen en filas (n).

$$W = \sum R_{ct}^2 \times \frac{12}{(n^2 \times k \times (k^2 - 1))} - \frac{3(k+1)}{k-1}$$

$$Q = n(k - 1)W$$

Los grados de libertad son $k-1$. Generalmente para consultar el nivel de significación se utiliza la aproximación χ^2 con $k-1$ grados de libertad, siempre que el número de columnas sea superior a 4 o el número de filas mayor de 15.

Coefficiente de correlación de Spearman.

Este test se utiliza para contrastar la dependencia de dos variables cuantitativas x e y , cuando se tienen sospechas de que las variables dadas siguen una distribución no normal. Como el resto de los test no paramétricos se basa en la asignación de rangos a los valores de las variables. Las hipótesis a contrastar son:

$H_0 \approx$ los valores que toma una variable aleatoria x son independientes de los que toma otra variable aleatoria y .

$H_1 \approx$ los valores altos de y suelen ir acompañados de valores altos (o bajos) de x .

Dada una muestra de n parejas de valores $(x_i; y_i)$, el proceso a seguir para estimar la fuerza de asociación no paramétrica entre x e y consiste en ordenar la muestra de los x_i de menor a mayor y asignarles rangos R_i del modo tradicional; hacer lo mismo con la muestra de los y_i ; anotar las n parejas de rangos obtenidos $(R_i; R'_i)$ y calcular para ellas el coeficiente de correlación usual que se llamará ahora r_s :

$$r_s = \frac{\sum (R_i - \bar{R}_i) \times (R'_i - \bar{R}'_i)}{\sqrt{\sum (R_i - \bar{R}_i)^2 \sum (R'_i - \bar{R}'_i)^2}}$$

Recta de regresión lineal simple y multivariante.

Partiendo de n 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 (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 :

$$y - \bar{y} = \frac{S_{xy}}{S_x} (x - \bar{x})$$

en la que S_x^2 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) es el número de parejas y (r) la correlación muestral, que se contrastará con una t_α 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 determinan 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: $\sum (x_i - \bar{x})^2$.

Se entiende por análisis multivariante a la parte de la estadística que estudia, interpreta y elabora el material estadístico sobre la base de un conjunto de $n > 1$ variables, que pueden ser de tipo cuantitativo y/o cualitativo. Las propiedades más determinantes del análisis multivariante son: las n variables son dependientes (en sentido estocástico), de naturaleza similar, ninguna de ellas tiene una importancia similar a las demás.

El modelo de regresión simple se generaliza en un modelo lineal de regresión múltiple cuando se incorporan más variables predictoras, que serían variables independientes cuantitativas y/o binarias, para explicar una variable dependiente

cuantitativa o criterio. Los principales objetivos o aplicaciones de la regresión lineal múltiple son:

- Explorar un conjunto de posibles variables explicativas para determinar aquellas que son importantes y las que no son importantes para predecir una determinada variable dependiente.
- Construir un índice pronóstico para predecir una respuesta o resultado (Y) a partir de un conjunto de variables explicativas (X).
- Ajuste estadístico, controlar los efectos de las variables de confusión en investigación no experimental.
- Detectar y valorar los efectos de interacción entre dos o más variables explicativas.

El supuesto básico de este modelo es la linealidad, que establece que la media de los valores de Y, para cada combinación de posibles valores de las variables X_1 y X_2 , es una función lineal de las variables X_1 y X_2 :

$$\mu_{Y|X_1, X_2} = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_n X_n$$

La variable dependiente no sigue una función lineal, ni existe ninguna ecuación para linealizarla, representa un plano o un hiperplano, por lo que también podemos referirnos a ella como superficie de respuesta o superficie de regresión.

RESULTADOS

8. Resultados

8.1. Descripción de caracteres cuantitativos.

El uso de la metodología estadística en la investigación de cualquiera de las facetas de las ciencias de la salud se ha revelado imprescindible para desarrollar una investigación de calidad y acorde con las exigencias de los tiempos presentes; por ello se ha incorporado al presente trabajo de tesis doctoral una metodología estadística descriptiva seguida de la consiguiente inferencia estadística.

Por su propia definición, la estadística se considera ligada a los métodos científicos en la toma, organización, recopilación, presentación y análisis de los datos, tanto para la deducción de conclusiones, como para tomar decisiones razonables de acuerdo con tales análisis. La parte de estos resultados que pretende sencillamente describir y analizar una serie de datos sin sacar conclusiones o hacer inferencias sobre la población diana se llama "estadística descriptiva", considerada como aspecto básico para desarrollar posteriormente inferencias sobre los valores de las variables pertenecientes a la muestra y traspolarlas a la población.

Las observaciones cuantitativas del tipo de las que manejamos en el presente proyecto de tesis doctoral, las podemos dividir en medidas discretas y continuas. Las medidas discretas son aquellas que pueden tomar sólo algunos valores dentro de un intervalo, el número de hijos sería ejemplo de variable cuantitativa discreta. Las medidas continuas son aquellas que pueden tomar cualquier valor dentro de un intervalo. Las variables categóricas de escala ordinal describen categorías ordenadas, pertenecen a esta categoría en nuestro ensayo la procedencia del microorganismo, categorizada como 0 "cepas patrón" y 1 "cepas nativas" obtenidas éstas últimas de individuos enfermos.

8.2. Medidas de tendencia central.

En ocasiones es importante ofrecer con un solo número, información sobre el nivel general de una serie de mediciones, que nos pueda servir para comparar dos o más distribuciones de una variable entre sí; este valor puede denominarse como medida de tendencia central, media o promedio. Un promedio es un valor que es típico o representativo de un conjunto de datos. Como tales valores tienden a situarse en el centro del conjunto de datos ordenados según su magnitud, los promedios se conocen también como "Medidas de Centralización". Se pueden definir varios tipos de estas medidas; las consideradas en este proyecto de tesis doctoral fueron la media aritmética muestral y la mediana. Si las observaciones se disponen en orden creciente o

decreciente la mediana ocupa el valor central. Si "n" es par no existe en rigor una observación central, en este caso, la mediana se define por convención como la media de las dos observaciones centrales. La mediana presenta algunas desventajas en relación con la media:

- No tiene en cuenta la magnitud exacta de la mayoría de las observaciones, por lo que supone una pérdida de información.
- Si se unen dos grupos de observaciones, la mediana del grupo resultante, no puede expresarse a partir de las medianas de los grupos componentes. Situación que sí es válida para la media.
- La mediana es mucho menos manejable que la media para el tratamiento matemático y se utiliza en tratamientos no paramétricos fundamentalmente.

Sin embargo la mediana es el estadístico de elección cuando consideramos distribuciones muy asimétricas o cuando consideramos variables de tipo ordinal.

Otra medida de tendencia central es la moda, que se define como el valor de la variable en que la curva de frecuencias alcanza el máximo. No suele utilizarse para los cálculos estadísticos fundamentalmente porque las fluctuaciones de las frecuencias pequeñas tienden a originar falsas modas y a causa de la ambigüedad de su definición.

8.3. Medidas de dispersión.

A veces, no basta con conocer los valores centrales, siendo preciso determinar en qué medida los datos numéricos están agrupados o no alrededor de la media. Al grado en que los datos numéricos tienden a extenderse alrededor de un valor medio se le denomina "Variancia o Dispersión de los datos". En este proyecto de tesis doctoral se emplearon las siguientes medidas de dispersión o variación:

- Rango. Definido como la diferencia entre el mayor y el menor representante de una distribución.
- Desviación típica (S). De todas las medidas de dispersión, es el estadígrafo que más se utiliza en la práctica; siendo necesaria su comprensión para la definición de otros muchos estadígrafos. Se define la desviación típica como la raíz cuadrada de la media aritmética de los cuadrados de las desviaciones respecto a la media. En nuestro proyecto se ha utilizado la desviación típica muestral. Si a la media se suma o resta la desviación estándar obtenemos un intervalo de muestra que comprende aproximadamente el 68% de las observaciones; si a la media se suma y resta el doble de la desviación estándar se obtiene un intervalo que incluye el 95% de los casos; si se suma y resta el triple de la desviación estándar obtenemos un intervalo que incluye el 99.7% de los casos.
- Varianza (S^2). Otro estadígrafo de gran importancia en el desarrollo de esta experiencia es la varianza, que se define como el cuadrado de la desviación típica.
- Error estándar de la media. El error típico de la media, es un estadígrafo que viene expresado por el cociente entre la desviación típica y la raíz cuadrada del número de individuos que componen la muestra. En términos conceptuales, el error típico de la media, es un estadígrafo que indica la fiabilidad del mismo. Cuando el error típico

es pequeño respecto de las unidades de medida, la media presenta una variación menor respecto al auténtico valor de la media poblacional, por tanto podemos tener más confianza en los resultados obtenidos.

- Coeficiente de variación. Es un índice de dispersión relativa del que no dependen las unidades de medida. Se calcula dividiendo la desviación estándar entre la media muestral.
- Percentil 10 y 90. Los percentiles son medidas de posición que se obtienen a partir de los sujetos ordenados para la variable cuya distribución se desea describir. En nuestro ensayo hemos utilizado los percentiles 10 y 90 calculados por el método de Haverage. Expresan los valores extremos de la distribución que nos enmarcan un 80% de valores con tendencia central.
- Amplitud intercuartil (IQR). Es una medida de dispersión de valor igual a la longitud que contiene el 50% central de los individuos de la dispersión.
- Asimetría-Curtosis. En términos corrientes, este concepto hace referencia a un desplazamiento de la curva de distribución en un sentido positivo o negativo (abscisas). Mientras que la curtosis va a definir el perfil de la curva en relación a un eje de ordenadas. En el caso de la asimetría un valor mayor que 0 indica una cola de la distribución prolongada por la derecha, simetría total si el valor es 0 y cola marcada por la izquierda cuando el valor es negativo. En lo referente al coeficiente de apuntamiento (curtosis), los valores mayores que 0 indican distribuciones muy apuntadas (leptocúrticas), si el valor es 0 la distribución es mesocúrtica, y cuando el valor es negativo la distribución es platicúrtica.

8.4. Test de Kolmogorov.

Aunque en general y según el teorema central del límite podemos considerar como distribuciones normales todas las relativas a variables biológicas cuando el número de muestreo sea superior a 30, utilizamos el test de Kolmogorov para conocer la normalidad de una distribución. El valor de K-S es positivo con un valor máximo de 1; un valor de K-S bajo indica alejamiento de la distribución normal. En general, se puede esperar normalidad cuando los valores de K-S son mayores de 0.9 (se rechaza el criterio de normalidad con K-S pequeña equivalente a una $p < 0.00005$).

8.5. Análisis descriptivo.

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

8.5.1. Descripción estadística de la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli*.

Como puede apreciarse en la Tabla 8.1, la dispersión (variancia) y las medidas de tendencia central de *Escherichia coli* en medio Müller-Hinton, ofrecen pocas

diferencias a excepción de las cepas incubadas con vitamina E y aMT a una concentración de 200 μM ; llama la atención que la incubación conjunta de aMT a aMT 200 μM + cloranfenicol devuelve a las cepas la misma dispersión en sus resultados que la observada con concentraciones menores de melatonina. El error estándar de la media presenta valores más pequeños en la distribución de *Escherichia coli* incubada con vitamina E y aMT a una concentración de aMT 200 μM . El valor de asimetría es máximo en las cepas incubadas con aMT 200 μM , vitamina E y aMT 200 μM + cloranfenicol; en todos los casos las distribuciones son bastante asimétricas con una marcada cola por la derecha. Los diagramas de caja especificados en la figura 8.1. muestran gráficamente lo referido. El grado de apuntamiento de la distribución (curtosis) es máximo en la distribución de *Escherichia coli* incubada con aMT 200 μM , vitamina E y aMT 200 μM + cloranfenicol. En los demás casos las distribuciones presentan un coeficiente de curtosis próximo a cero, por tanto tienen una distribución mesocúrtica.

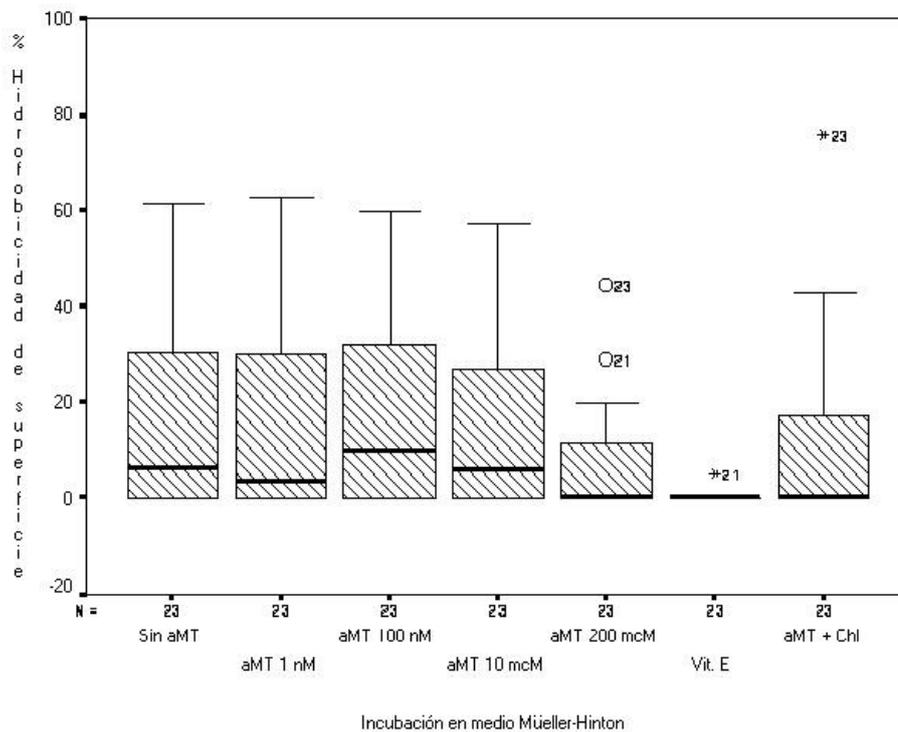


Figura 8.1. Diagrama de caja para la variable hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton en presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Tabla 8.1.

Estadística descriptiva de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* en medio Müeller-Hinton (MH) tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	16,95 (21,33)	16,61 (21,19)	16,17 (19,04)	16,08 (19,9)	6,45 (11,59)	0,23 (1,10)	11,24 (19,06)
Intervalo confianza 95%, media	7,7-26,1	7,4-25,7	7,9-24,4	7,4-24,7	1,4-11,4	0,2-0,7	3,0-19,4
Error estándar media	4,44	4,41	3,97	4,15	2,41	0,23	3,97
Mediana (DS)	6,46	3,55	9,63	5,94	0	0	0
Varianza	455	449	362	397	134	1	363
Valor mínimo	0	0	0	0	0	0	0
Valor máximo	61,45	62,79	59,8	57,0	44,3	5,3	75,6
Asimetría	0,96	1,03	0,83	0,98	2,10	4,79	2,15
Error estándar asimetría	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Curtosis	- 0,57	- 0,20	- 0,55	- 0,43	4,47	23,0	5,0
Error estándar curtosis	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
Amplitud intercuartil (IQC)	34,48	33,13	34,66	29,03	11,77	0	19,33
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,24 (0,001)	0,25 (0,001)	0,24 (0,001)	0,22 (0,004)	0,34 (0,000)	0,53 (0,000)	0,31 (0,000)
Percentiles 10 - 90	0-54,7	0-56,7	0-45,0	0-53	0-25,4	-	0-38,6

La Tabla 8.1 muestra los valores estadísticos descriptivos de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* cultivada en medio Müeller-Hinton con concentraciones estándar de hierro. Como puede observarse los valores medios de hidrofobicidad son menores tras incubación con melatonina a altas concentraciones y vitamina E. En todos los casos excepto en las situaciones en que se incubaba con vitamina E las desviaciones estándar son amplias, por tanto los intervalos de confianza de la media son igualmente amplios. Igualmente la amplitud intercuartil (IQC) es máxima cuando incubamos *Escherichia coli* con concentraciones más bajas de melatonina. Las distribuciones son más asimétricas al incubarse con melatonina a altas dosis o con vitamina E, en los tres casos con una marcada cola por la derecha. Las distribuciones son prácticamente mesocúrticas en todos los casos excepto en las correspondientes a *Escherichia coli* incubado con melatonina a una concentración de 200 µM y vitamina E. En ninguna de las 7 distribuciones puede asumirse el supuesto de normalidad (Test de Kolmogorov).

Tabla 8.2.

Estadística descriptiva de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* en medio Müller-Hinton + ácido etilen-diamino-dihidroxifenil-acético (MH-EDDA), tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	17,63 (19,70)	16,07 (20,57)	17,96 (19,74)	17,62 (21,10)	10,11 (13,94)	4,08 (17,69)	11,86 (17,26)
Intervalo confianza 95%, media	9,1-26,1	7,1- 24,9	9,4- 26,5	8,4- 26,7	4,0-16,1	3,5- 11,7	4,3-19,3
Error estándar media	4,10	4,28	4,11	4,40	2,90	3,68	3,59
Mediana (DS)	12,32	5,70	14,47	0,55	0,50	0	0,36
Varianza	388	423	390	445	194	313	298
Valor mínimo	0	0	0	0	0	0	0
Valor máximo	59,56	61,97	66,92	61,13	50,10	84,77	65,92
Asimetría	0,78	1,18	0,84	0,73	1,35	4,70	1,76
Error estándar asimetría	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Curtosis	- 0,57	0,14	- 0,12	- 0,88	1,42	22,37	3,25
Error estándar curtosis	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
Amplitud intercuartil (IQC)	33,79	28,27	33,71	32,35	18,26	0	20,72
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,22 (0,005)	0,22 (0,004)	0,22 (0,003)	0,31 (0)	0,28 (0)	0,50 (0)	0,26 (0)
Percentiles 10 - 90	0-51,9	0-56,4	0-46,4	0-53	0-29,5	0-5,54	0-37,9

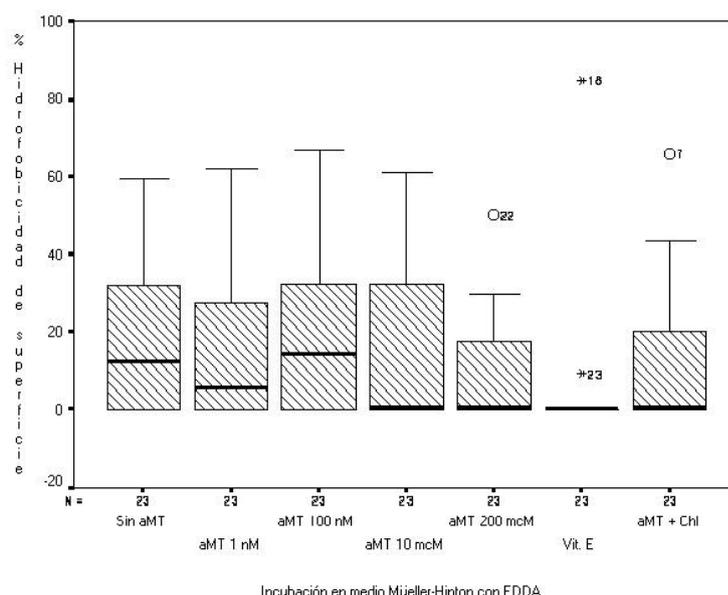


Figura 8.2. Diagrama de caja para la variable hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton con EDDA y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Al igual que lo que veíamos para *Escherichia coli* incubada en presencia de concentraciones estándar de hierro al restringir el contenido en hierro del medio de cultivo adicionando EDDA, obtenemos valores medios de hidrofobicidad de superficie más bajos tras incubación con concentraciones más altas de melatonina o vitamina E. Las desviaciones estándar son amplias en todas las distribuciones; siendo la variabilidad de los datos menor en la distribución de *Escherichia coli* incubada con melatonina a una concentración de 200 μM . La distribución es marcadamente leptocúrtica tras incubación de *Escherichia coli* con vitamina E, distribución que también se muestra marcadamente asimétrica con una marcada cola por la derecha. Como comentábamos para la Tabla 8.1 en ningún caso el supuesto de normalidad es asumible.

Tabla 8.3.

Estadística descriptiva de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* en medio Müeller-Hinton + citrato amónico-ferroso (MH-FAC) tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 μM	aMT 200 μM	Vit. E	Chl. 100 $\mu\text{g/ml}+$ aMT 200 μM
Media (DS)	15,26 (19,58)	16,94 (20,48)	15,53 (19,81)	18,09 (21,51)	8,48 (12,85)	-	12,37 (20,94)
Intervalo confianza 95%, media	6,7-23,7	8-25,8	6,9-24,0	8,7-27,4	2,9-14	-	3,3-21,4
Error estándar media	4,08	4,27	4,13	4,48	2,68	-	4,36
Mediana (DS)	4,40	5,47	5,38	9,40	0	-	0
Varianza	383	419	392	463	165	-	438
Valor mínimo	0	0	0	0	0	-	0
Valor máximo	53,56	59,16	51,87	60,26	40,36	-	87,04
Asimetría	0,96	1,02	0,92	0,77	1,34	-	2,41
Error estándar asimetría	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	-	0,48
Curtosis	- 0,63	- 0,40	- 0,81	- 0,91	0,59	-	6,74
Error estándar curtosis	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	-	0,93
Amplitud intercuartil (IQC)	31,50	35,52	33,16	37,60	17,05	-	19,02
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,26 (0)	0,23 (0,002)	0,25 (0,001)	0,27 (0)	0,35 (0)	-	0,28 (0)
Percentiles 10 - 90	0-50,9	0-54,8	0-50,0	0-54,6	0-32,5	-	0-41,5

En la Tabla 8.3, que describe los valores de hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* tras adicionar hierro al medio de cultivo, no encontramos valores en la columna correspondiente a la incubación con vitamina E en blanco, ello se debe a que todos los resultados medidos en estas condiciones mostraron un valor de 0, por tanto al comportarse como una constante difícilmente podemos dar valores descriptivos para esta variable. En el resto de las condiciones de cultivo seguimos encontrando los menores valores de hidrofobicidad tras incubación con melatonina a altas concentraciones y vitamina E. Existe mínima variabilidad de los datos tras incubación con melatonina 200 μM . Distribuciones prácticamente mesocúrticas en todos los casos excepto al añadir

cloranfenicol a concentraciones subletales al medio de cultivo. Como en los casos previos se rechaza el supuesto de normalidad.

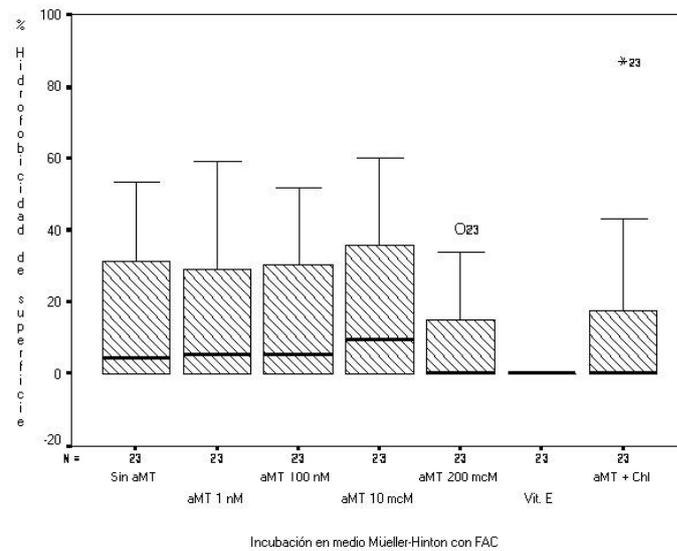


Figura 8.3. Diagrama de caja para la variable hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton con FAC y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

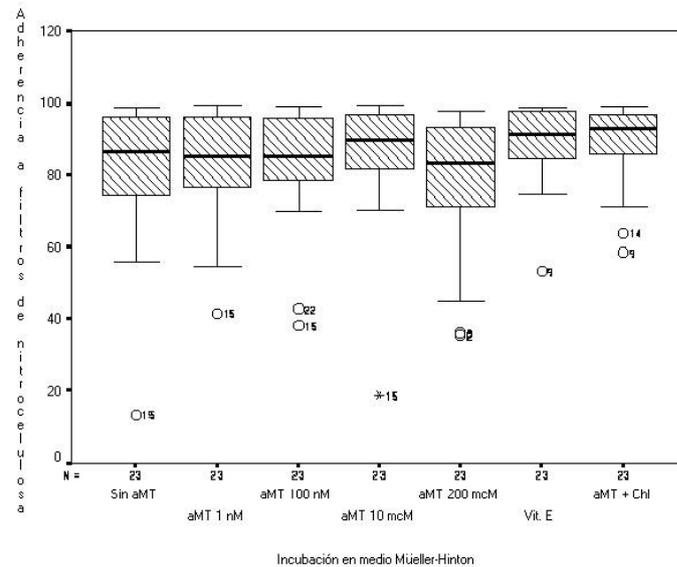


Figura 8.4. Diagrama de caja para la variable adherencia a filtros de nitrocelulosa por *Escherichia coli* tras incubación en medio Müller-Hinton y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Tabla 8.4.

Estadística descriptiva de la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli* en medio Müller-Hinton (MH) tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nMol	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	81,38 (19,15)	83,09 (15,54)	83,53 (16,48)	85,75 (17,16)	77,76 (19,09)	89,17 (10,80)	88,64 (11,69)
Intervalo confianza 95%, media	73,1- 89,6	76,3- 89,8	76,4- 90,6	78,3- 93,17	69,5-86	84,5- 93,8	83,5-93,7
Error estándar media	3,99	3,24	3,43	3,57	3,98	2,25	2,43
Mediana (DS)	86,22	84,89	84,78	89,62	83,43	91,33	92,44
Varianza	367	241	271	294	364	116	136
Valor mínimo	13,35	41,70	38,20	18,89	35,52	53,06	58,53
Valor máximo	98,94	99,65	99,39	99,57	98,03	99,17	99,53
Asimetría	- 2,18	- 1,07	- 1,57	- 2,84	- 1,13	- 1,85	- 1,37
Error estándar asimetría	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Curtosis	6,52	0,90	2,51	10,50	0,30	4,58	1,08
Error estándar curtosis	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
Amplitud intercuartil (IQC)	22,43	21,33	19,95	16,74	24,44	13,86	12,92
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,18 (0,052)	0,15 (0,142)	0,17 (0,07)	0,21 (0,01)	0,19 (0,02)	0,17 (0,05)	0,20 (0,01)
Percentiles 10 - 90	58,4- 98,1	57,8- 99,2	53,7- 99,3	72-99,2	39,5- 95,9	75,6- 98,4	66,8-98,9

La Tabla 8.4 muestra altos porcentajes de adherencia a los filtros de nitrocelulosa por *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton + melatonina o vitamina E. Observamos los valores medios más bajos en la distribución correspondiente a la incubación con melatonina a una concentración 200 µM, que no obstante muestra un intervalo de confianza más amplio y un intervalo intercuartil mayor. Las distribuciones son asimétricas con una cola marcada por la izquierda, leptocurtosis en todos los casos, más intensa tras incubación con melatonina a concentraciones medias. Se rechaza el supuesto de normalidad en todos los casos excepto en la distribución correspondiente a incubación con melatonina 1 nM.

La Tabla 8.5 refiere los datos de adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli* en medio Müller-Hinton con restricción de hierro (EDDA). Los porcentajes medios de adherencia son altos en todos los casos, si bien más bajos tras incubación con melatonina a una concentración 200 µM, donde la variabilidad de la distribución (variancia) es también máxima. El coeficiente de curtosis es máximo tras incubación sin adicción de melatonina y el coeficiente de simetría hace prever la existencia de una cola por la izquierda. Se rechaza en todos los casos el supuesto de normalidad.

Tabla 8.5.

Estadística descriptiva de la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli* en medio Müller-Hinton + ácido etilen-diamino-dihidroxifenil-acético (MH-EDDA), tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 mcg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	78,85 (24,16)	75,95 (19,99)	79,78 (16,34)	76,95 (24,09)	71,81 (24,97)	86,26 (13,63)	83,51 (18,09)
Intervalo confianza 95%, media	68,4-89,3	67,3- 84,6	72,7- 86,8	66,5- 87,3	61,0- 82,6	80,3- 92,1	75,4-91,1
Error estándar media	5,03	4,16	3,40	5,02	5,20	2,84	3,77
Mediana (DS)	89,86	78,52	80,96	80,56	79,38	92,88	88,65
Varianza	583	399	267	580	623	185	327
Valor mínimo	0	32,80	41,61	19,10	0	55,91	33,39
Valor máximo	99,99	99,37	99,37	99,22	98,87	99,35	98,74
Asimetría	- 1,76	- 0,80	- 0,66	- 1,16	- 1,59	- 1,18	- 1,51
Error estándar asimetría	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Curtosis	3,86	-0,13	- 0,41	0,40	2,66	0,15	1,77
Error estándar curtosis	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
Amplitud intercuartil (IQC)	27,85	29,08	24,84	33,50	30,02	17,63	24,99
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,20 (0,01)	0,12 (0,20)	0,16 (0,09)	0,19 (0,02)	0,17 (0,06)	0,21 (0,008)	0,25 (0)
Percentiles 10 - 90	50,7-98,9	38,7- 97,7	55,7- 98,5	32,6- 98,8	28,8- 97,0	59,6- 97,7	50,2-98,4

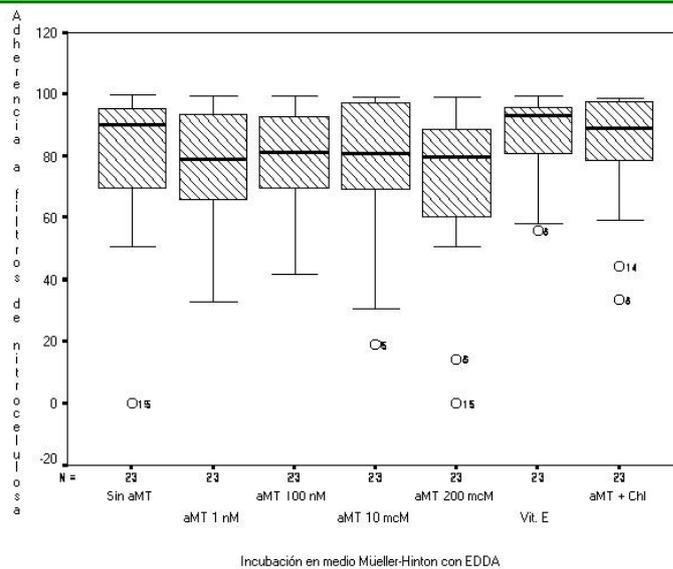


Figura 8.5. Diagrama de caja para la variable adherencia a filtros de nitrocelulosa por *Escherichia coli* tras incubación en medio Müller-Hinton con restricción de hierro (EDDA) y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Tabla 8.6.

Estadística descriptiva de la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli* en medio Müeller-Hinton + citrato amónico-ferroso (MH-FAC) tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 mcg/ml + aMT 200 µM
Media (DS)	84,86 (13,68)	84,55 (15,15)	84,11 (16,54)	82,20 (20,51)	72,86 (24,73)	90,04 (11,14)	88,62 (11,64)
Intervalo confianza 95%, media	78,9- 90,7	78,0- 91,1	76,9-91,2	73,3- 91,0	62,1- 83,5	85,2- 94,8	83,5-93,6
Error estándar media	2,85	3,15	3,45	4,27	5,15	2,32	2,42
Mediana (DS)	89,14	86,95	91,09	88,88	80,33	95,42	93,92
Varianza	187	229	273	420	611	124	135
Valor mínimo	48,79	36,78	36,42	19,10	15,31	61,20	59,29
Valor máximo	99,59	99,82	99,48	99,36	98,77	99,52	99,32
Asimetría	- 1,04	- 1,57	- 1,33	- 1,87	- 0,93	- 1,33	- 1,36
Error estándar asimetría	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48	0,48
Curtosis	0,60	3,23	1,67	3,43	- 0,02	0,82	1,15
Error estándar curtosis	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93
Amplitud intercuartil (IQC)	22,21	19,68	22,06	17,94	44,01	15,19	12,95
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0,18 (0,03)	0,15 (0,14)	0,18 (0,04)	0,25 (0)	0,18 (0,03)	0,22 (0,003)	0,2 (0,01)
Percentiles 10 – 90	63,9- 99,3	63,4- 99,3	59,6-99,1	44,3- 99,2	30,4- 98,4	69,8- 99,0	65,2-99,0

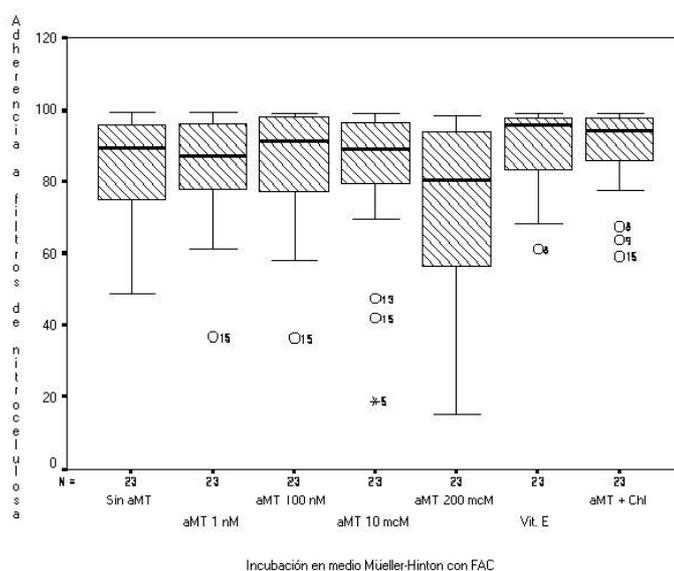


Figura 8.6. Diagrama de caja para la variable adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada en medio Müeller-Hinton con FAC y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

La Tabla 8.6 muestra los valores correspondientes a los porcentaje de adherencia a filtros de nitrocelulosa por parte de *Escherichia coli*. Conforme a lo comentado en Tablas anteriores los menores porcentajes de adherencia los encontramos tras incubación de *Escherichia coli* en presencia de melatonina 200 μM . Donde el valor del error estándar de la media es mayor, así como la variabilidad de la muestra. Las distribuciones son todas ellas asimétricas con una cola por la izquierda. El coeficiente de curtosis muestra valores próximos a cero (mesocurtosis) en las distribuciones correspondientes a incubación sin melatonina y melatonina 200 μM . Se rechaza el supuesto de normalidad en todos los casos excepto tras incubación con melatonina 1 nM.

8.5.2. Descripción estadística de la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis*.

Como puede apreciarse en la Tabla 8.7 los valores medios de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada con aMT 200 μM son mayores que la observada en *Neisseria meningitidis* incubada con concentraciones menores de aMT; donde además la variabilidad de la muestra es mayor. Al incubar *Neisseria meningitidis* en medios MH con vitamina E se observan unos valores medios considerablemente inferiores que los observados al incubar sin aMT; de forma similar a lo que ocurre al incubar con aMT 200 μM + cloranfenicol. La distribución aMT 200 μM es considerablemente asimétrica con una cola marcada por la izquierda; puede asumirse el supuesto de normalidad en todos los casos excepto en esta última distribución.

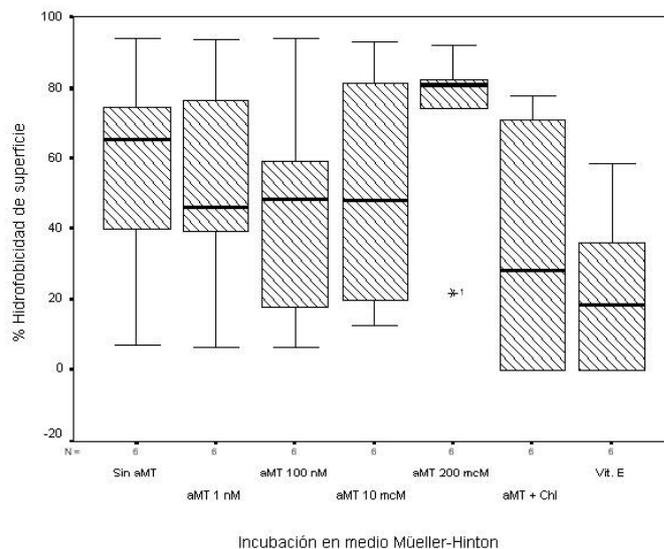


Figura 8.7. Diagrama de caja para la variable hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton en presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Tabla 8.7.

Estadística descriptiva de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* en medio Müller-Hinton (MH) tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	57,51 (30,88)	51,18 (30,53)	45,60 (31,79)	50,34 (32,59)	71,79 (25,10)	21,86 (23,15)	34,25 (33,89)
Intervalo confianza 95%, media	25,1- 89,9	19,3-83,2	12,2- 78,9	16,1- 84,5	45,4- 98,1	- 2,4- 46,1	- 1,3-69,8
Error estándar media	12,60	12,46	12,97	13,30	10,24	9,45	13,83
Mediana (DS)	65,08	45,93	48,22	47,81	80,62	18,36	28,30
Varianza	953	932	1010	1062	630	536	1148
Valor mínimo	6,90	6,30	6,20	12,65	21,92	0	0
Valor máximo	94,02	93,50	93,9	92,74	91,73	58,40	77,99
Asimetría	- 0,78	-0,01	0,32	0,19	- 2,15	0,69	0,39
Error estándar asimetría	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Curtosis	0,36	-0,06	- 0,39	- 1,88	4,97	- 0,63	- 1,88
Error estándar curtosis	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74
Amplitud intercuartil (IQC)	47,64	49,68	53,07	66,04	23,58	41,62	72,68
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,20 (0,200)	0,18 (0,200)	0,16 (0,200)	0,16 (0,200)	0,36 (0,012)	0,20 (0,200)	0,19 (0,200)
Percentiles 10 – 75	6,90- 79,17	6,30- 80,60	6,20- 67,93	12,65- 84,08	21,92- 84,44	0-41,62	0-72,68

La Tabla 8.8 muestra unos valores medios de hidrofobicidad de superficie en *Neisseria meningitidis* ligeramente mayores al incubar en medio MH-EDDA con concentraciones más altas de aMT. Llama la atención que las hidrofobicidades medias prácticamente son cero cuando se incuba con vitamina E, algo similar a lo que ocurre al incubar con aMT + cloranfenicol. Las distribuciones son más asimétricas en estos últimos casos y leptocúrticas. El resultado del test de Kolmogorov permite rechazar la hipótesis de normalidad de la mayoría de las distribuciones.

En la Tabla 8.9 se continúan observando valores de hidrofobicidad de superficie ligeramente más altos al incubar con aMT 200 µM en presencia de un suplemento de hierro en el medio de cultivo. La incubación con vitamina E o aMT + cloranfenicol continúa mostrando valores de hidrofobicidad de superficie más bajos. Las distribuciones son relativamente asimétricas en todos los casos excepto cuando *Neisseria meningitidis* es incubada sin aMT o bajas concentraciones de aMT. En la mayoría de las distribuciones puede asumirse el supuesto de normalidad.

Tabla 8.8.

Estadística descriptiva de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* en medio Müller-Hinton + ácido etilen-diamino-dihidroxifenil-acético (EDDA), tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	Amt 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	65,68 (35,03)	56,48 (32,31)	65,40 (32,87)	72,39 (20,60)	76,66 (31,32)	2,63 (6,45)	11,90 (19,65)
Intervalo confianza 95%, media	28,9- 102,4	22,5- 90,3	30,9- 99,9	50,7-94	43,7- 109,5	- 4,1- 9,4	- 8,7-32,5
Error estándar media	14,30	13,19	13,42	8,41	12,78	2,63	8,02
Mediana (DS)	83,72	67,96	80,85	75,31	88,36	0	0
Varianza	1227	1044	1080	424	981	41	386
Valor mínimo	16	15,97	15,85	36,38	31,32	0	0
Valor máximo	92,76	91,92	94,44	91,73	13,25	15,81	46,47
Asimetría	- 0,93	- 0,61	-0,96	- 1,13	-2,36	2,44	1,45
Error estándar asimetría	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Curtosis	- 1,67	- 1,76	- 1,24	1,36	5,66	6	0,96
Error estándar curtosis	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74
Amplitud intercuartil (IQC)	68,61	64,83	61,70	34,38	26,03	3,95	30,32
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,33 (0,040)	0,25 (0,200)	0,34 (0,029)	0,20 (0,200)	0,42 (0,001)	0,49 (0)	0,39 (0,004)
Percentiles 10 – 75	16-92,12	15,97- 81,56	15,85- 89,80	36,38- 91,56	13,24- 92,25	0-3,95	0-30,32

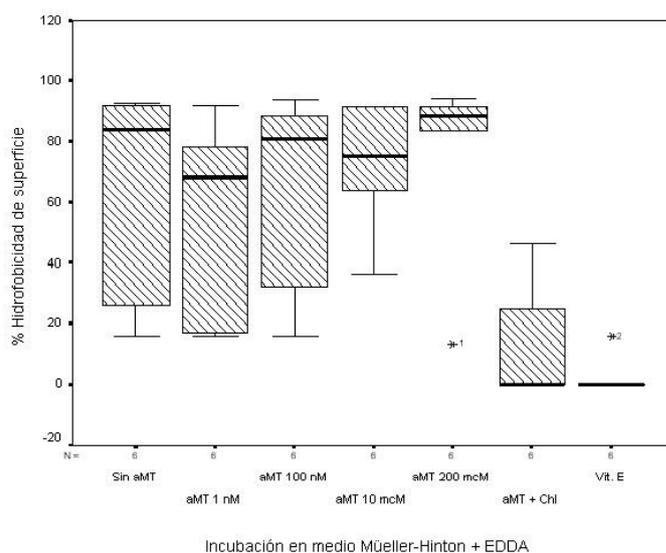


Figura 8.8. Diagrama de caja para la variable hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton con EDDA y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Tabla 8.9.

Estadística descriptiva de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* en medio Müller-Hinton + citrato amónico-ferroso (MH-FAC) tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	52,94 (31,87)	52,46 (33,39)	61,35 (28,75)	60,42 (28,36)	73,47 (21,22)	15,36 (21,98)	26,59 (34)
Intervalo confianza 95%, media	19,4- 86,3	17,4- 87,5	31,1- 91,5	30,6- 90,1	51,1- 95,7	- 7,7- 38,4	- 9-62,2
Error estándar media	13,01	13,63	11,73	11,58	8,66	8,97	13,88
Mediana (DS)	44,69	51,82	64,18	61,94	76,14	8,74	18,41
Varianza	1015	1115	826	804	450	483	1156
Valor mínimo	7,50	6,90	10,45	14,51	33,58	0	0
Valor máximo	94,78	93,89	94,21	94,06	96,75	58,35	85,20
Asimetría	0,07	- 0,07	- 1,12	- 0,64	- 1,56	2,01	1,12
Error estándar asimetría	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Curtosis	- 0,58	- 1,26	1,97	0,26	3,52	4,33	0,72
Error estándar curtosis	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74
Amplitud intercuartil (IQC)	54,08	66,15	40,58	47,11	22,64	26,83	49,45
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,26 (0,200)	0,16 (0,200)	0,23 (0,200)	0,15 (0,200)	0,35 (0,018)	0,31 (0,062)	0,28 (0,145)
Percentiles 10 - 75	7,50- 87,07	6,90- 87,05	10,45- 84,04	14,51- 85,90	33,58- 86,94	0-26,83	0-49,45

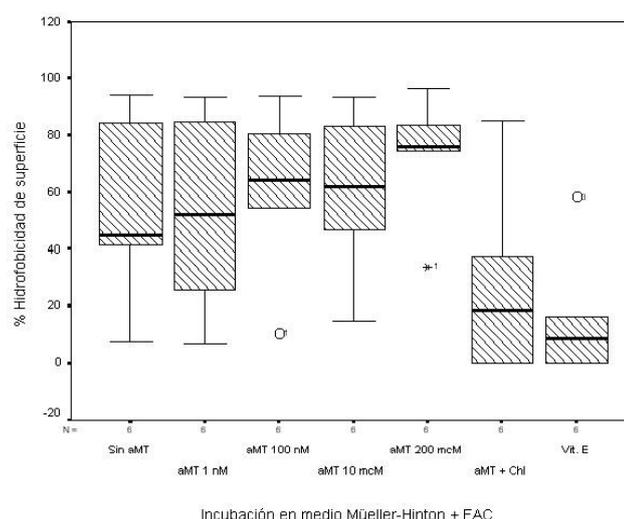


Figura 8.9. Diagrama de caja para la variable hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton con FAC y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Tabla 8.10.
Estadística descriptiva de la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* en medio Müeller-Hinton (MH) tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	AMT 1 nMol	AMT 100 nM	AMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	89,94 (15,87)	89,04 (21,07)	88,62 (23,28)	89,91 (19,78)	98,66 (2,48)	99,39 (1,47)	99,65 (0,85)
Intervalo confianza 95%, media	73,2- 106,6	66,9- 111,1	64,1- 113	69,1- 110,6	96-101,2	97,8- 100,9	98,7-100,5
Error estándar media	6,48	8,60	9,50	8,07	1,01	0,60	0,35
Mediana (DS)	97,62	444	98	97,62	100	100	100
Varianza	252	21,07	542	391	6	2	0
Valor mínimo	58,28	46,15	41,12	49,61	93,81	96,38	97,90
Valor máximo	98,61	98,73	98,84	99,56	100	100	100
Asimetría	- 2,22	- 2,41	- 2,44	- 2,43	- 2,04	- 2,44	- 2,44
Error estándar asimetría	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Curtosis	5	5,87	5,98	5,92	4,10	6	6
Error estándar curtosis	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74
Amplitud intercuartil (IQC)	16,42	16,28	15,54	14,49	2,92	0,90	0,52
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0,34 (0,022)	0,43 (0,001)	0,47 (0)	0,45 (0)	0,37 (0,010)	0,49 (0)	0,49 (0)
Percentiles 10 - 75	58,28- 98,15	46,15- 98,70	41,12- 98,69	49,61- 99,04	93,81- 100	96,38- 100	97,90-100

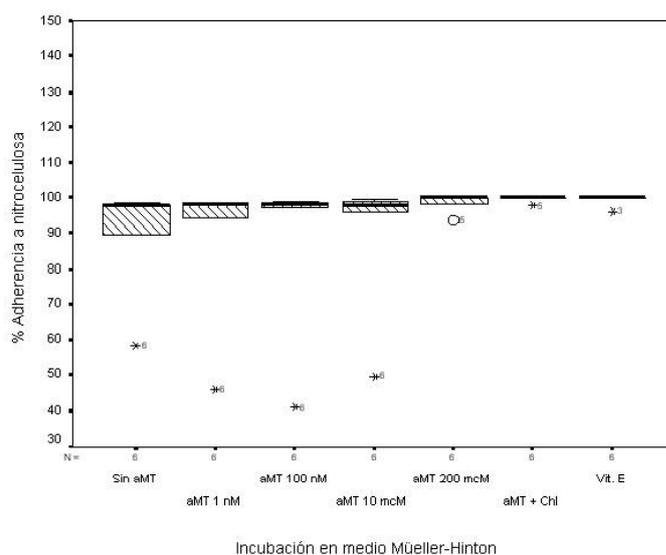


Figura 8.10. Diagrama de caja para la variable adherencia a filtros de nitrocelulosa por *Neisseria meningitidis* tras incubación en medio Müeller-Hinton y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

En la Tabla 8.10 se muestran los valores de adherencia de *Neisseria meningitidis* a la nitrocelulosa tras incubación en medio Müeller-Hinton. Se observan porcentajes de adherencia mayores en las distribuciones correspondientes a incubación con aMT 200 μ M, vitamina E y aMT 200 μ M + cloranfenicol a dosis subletales; además la variabilidad de estas distribuciones es mínima, apreciándose cierto grado de leptocurtosis en todas las distribuciones y asimetría con una cola marcada por la izquierda. No puede asumirse el supuesto de normalidad.

Al incubar *Neisseria meningitidis* en medio MH-EDDA observamos porcentajes medios de adherencia a la nitrocelulosa mayores en la distribución correspondiente a aMT 200 μ M + cloranfenicol, donde el error estándar de la media es muy pequeño y en consecuencia el intervalo de confianza de la media es más estrecho. Las distribuciones son leptocúrticas en todos los casos excepto en las incubadas con aMT 1 nM y 10 μ M. Puede aceptarse el supuesto de normalidad de las distribuciones de *Neisseria meningitidis* incubadas con concentraciones de aMT más bajas.

Tabla 8.11.

Estadística descriptiva de la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* en medio Müeller-Hinton + ácido etilen-diamino-dihidroxifenil-acético (MH-EDDA), tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	aMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 μ M	aMT 200 μ M	Vit. E	Chl. 100 mcg/ml+ aMT 200 μ M
Media (DS)	87,56 (10,78)	94,04 (3,04)	91,63 (3,04)	96,19 (2,63)	97,08 (3,27)	96,47 (5,02)	99,91 (0,21)
Intervalo confianza 95%, media	76,2-98,8	90,8- 97,2	91,6- 84,8	93,4- 98,9	93,6- 100,5	91,2- 101,7	99,6- 100,1
Error estándar media	4,40	1,24	2,62	1,07	1,33	2,05	0,088
Mediana (DS)	88,23	93,45	92,63	95,93	97,72	99,43	100
Varianza	116	9	41	6	10	25	4
Valor mínimo	71,42	90,19	80,48	92,07	93,26	90	99,47
Valor máximo	98,15	98,58	98,68	99,32	100	100	100
Asimetría	- 0,47	0,45	- 1,07	- 0,38	- 0,18	- 0,95	- 2,44
Error estándar asimetría	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Curtosis	- 1,30	- 0,56	1,28	- 0,02	- 2,87	- 1,87	6
Error estándar curtosis	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74
Amplitud intercuartil (IQC)	19,12	5,46	8,81	4,52	6,32	10	0,13
Test de Kolmogorov– Smirnov, (P)	0,21 (0,200)	0,22 (0,200)	0,22 (0,200)	0,17 (0,200)	0,31 (0,067)	0,36 (0,011)	0,49 (0)
Percentiles 10 - 75	71,42- 98,01	90,19- 97,05	80,48- 96,32	92,07- 98,90	93,26- 100	90-100	99,47-100

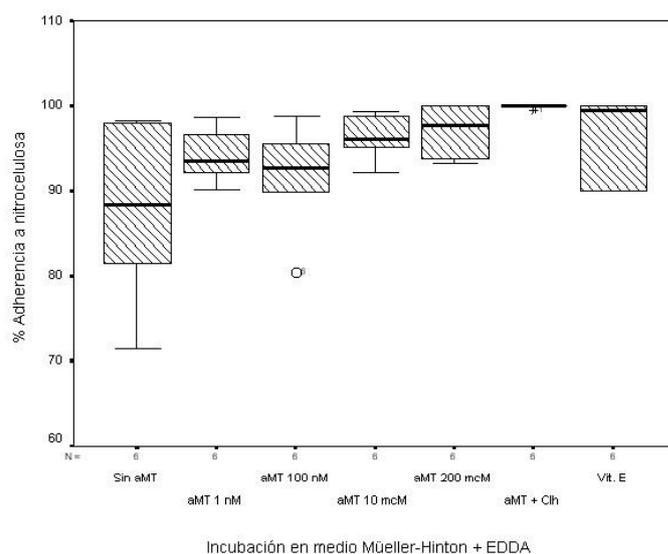


Figura 8.11. Diagrama de caja para la variable adherencia a filtros de nitrocelulosa por *Neisseria meningitidis* tras incubación en medio Müeller-Hinton con restricción de hierro (EDDA) y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

Tabla 8.12.

Estadística descriptiva de la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* en medio Müeller-Hinton + citrato amónico-ferroso (MH-FAC), tras incubación con diferentes concentraciones de melatonina, vitamina E y cloranfenicol + melatonina.

	Sin aMT	AMT 1 nM	aMT 100 nM	aMT 10 µM	aMT 200 µM	Vit. E	Chl. 100 µg/ml+ aMT 200 µM
Media (DS)	91,69 (10,35)	93,61 (4,56)	89,93 (14,23)	89,23 (16,51)	99,23 (1,87)	99,92 (0,11)	99,73 (0,64)
Intervalo confianza 95%, media	80,8- 102,5	88,8- 98,4	74,9- 104,8	71,9- 106,5	97,2- 101,2	99,8- 100	99-100,4
Error estándar media	4,22	1,86	5,81	6,74	0,76	4,66	0,26
Mediana (DS)	94,66	94,23	94,62	96,91	100	100	100
Varianza	107	20	202	272	3	1	0
Valor mínimo	72,22	87,78	61,79	57,07	95,40	99,76	98,43
Valor máximo	99,15	98,90	98,91	99,45	100	100	100
Asimetría	- 1,69	- 0,22	- 2,12	- 2,02	- 2,44	- 1,02	- 2,44
Error estándar asimetría	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84	0,84
Curtosis	2,98	- 2,09	4,71	4,07	6	- 1,55	6
Error estándar curtosis	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74	1,74
Amplitud intercuartil (IQC)	12,92	8,97	15,34	20,33	1,15	0,21	0,39
Test de Kolmogorov- Smirnov, (P)	0,29 (0,121)	0,21 (0,200)	0,35 (0,016)	0,33 (0,040)	0,49 (0)	0,40 (0,002)	0,49 (0)
Percentiles 10 - 75	72,22- 98,94	87,78- 97,76	61,79- 98,88	57,07- 99,12	95,40- 100	99,76- 100	98,43-100

Al añadir un suplemento de hierro al medio de cultivo (Tabla 8.12), los porcentajes de adherencia de *Neisseria meningitidis*, más altos los observamos al incubarlo con aMT 200 μ M, vitamina E y aMT + cloranfenicol; esta última distribución muestra el error estándar de la media más bajo y en consecuencia menor intervalo de confianza de la media. Excepto en las distribuciones incubadas con aMT a concentraciones más bajas, en ningún caso puede asumirse el supuesto de normalidad.

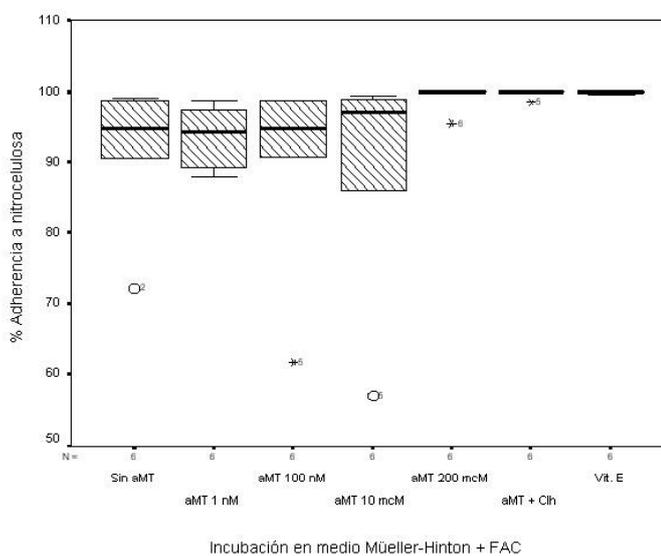


Figura 8.12. Diagrama de caja para la variable adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton con FAC y presencia de diversas concentraciones de melatonina, melatonina + cloranfenicol y vitamina E.

8.6. Inferencia estadística.

8.6.1. Test de comparación de un conjunto de muestras relacionadas.

Aunque *a priori* el conjunto de variables incluidas en este Proyecto de Tesis Doctoral podrían considerarse típicas variables biológicas, la realización de un test de Kolmogorov permitió comprobar que en su mayoría las distribuciones no se ajustaban a la normal, por consiguiente deben utilizarse en este apartado técnicas estadísticas que tengan en cuenta ese aspecto. Realizamos en consecuencia un test de comparación de Wilcoxon para variables relacionadas, al comparar tanto la hidrofobicidad de superficie como la adherencia a la nitrocelulosa en cepas incubadas sin melatonina y concentraciones crecientes de melatonina o vitamina E. Seguidamente se muestran los resultados del test de Wilcoxon, cuyo fundamento se expone en el apartado de Material y Método.

Comparación de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*.

En *Escherichia coli* se observa una disminución significativa de la hidrofobicidad de superficie cuando es incubada con aMT 200 μM . La incubación de *Escherichia coli* con concentraciones inferiores a 200 μM no modifica significativamente la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*. La vitamina E también disminuye de forma estadísticamente significativa la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en MH, que es significativamente inferior a la hidrofobicidad de superficie observada tras incubación de *Escherichia coli* con aMT 200 μM ; sin embargo, la hidrofobicidad observada en *Escherichia coli* incubado con aMT 200 μM + cloranfenicol no difiere de la hidrofobicidad observada con aMT 200 μM ; lo que sugiere que *a priori* la síntesis proteica (inhibida por el cloranfenicol a concentraciones subletales) carece de efecto sobre los cambios de la hidrofobicidad de superficie inducidos por la aMT a altas concentraciones.

Tabla 8.13.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton (MH); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	66/54	8,2/7,7	8/7	-0,34 (0,73)
Sin aMT/aMT 100 nM	72,5/45,5	8/7,9	9/6	-0,71 (0,47)
Sin aMT/aMT 10 μM	83/37	7,5/9,2	11/4	-1,30 (0,19)
Sin aMT/aMT 200 μM	115/21	8,8/7	13/3	-2,43 (0,01)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	38/67	6,3/8,3	6/8	-0,91 (0,36)
aMT 1 nM/aMT 10 μM	38/82	6,3/9,1	6/9	-1,25 (0,21)
aMT 1 nM/aMT 200 μM	19/101	9,5/7,7	2/13	-2,32 (0,02)
aMT 100 nM/aMT 10 μM	61/44	8,7/6,2	7/7	-0,53 (0,59)
aMT 100 nM/aMT 200 μM	12/93	6/7,7	2/12	-2,54 (0,01)
aMT 10 μM /aMT 200 μM	12/93	3/9,3	4/10	-2,54 (0,01)
Sin aMT/Vitamina E	105/0	7,5/0	14/0	-3,29 (0,001)
Sin aMT/aMT 200 μM + Chl	102/34	8,5/8,5	12/4	-1,75 (0,07)
aMT 200 μM / aMT 200 μM + Chl	85/35	8,5/7	10/5	-1,42 (0,15)
aMT 200 μM /Vitamina E	0/45	0/5	0/9	-2,66 (0,008)

La comparación de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en medio MH-EDDA (Tabla 8.14), permite observar una hidrofobicidad media significativamente inferior al adicionar al medio de cultivo vitamina E; así observamos diferencias estadísticamente significativas al realizar el test de Wilcoxon entre *Escherichia coli* aMT 200 μM y vitamina E; aMT 10 μM y aMT 200 μM ; vitamina E y ausencia de aMT. La hidrofobicidad media resultante de la incubación con aMT 200 μM o aMT 200 μM + cloranfenicol a concentraciones subletales no difiere

significativamente, de donde se deduce que en los cambios de hidrofobicidad de superficie observados con aMT a mayores concentraciones no están implicados la síntesis de proteínas *de novo*”.

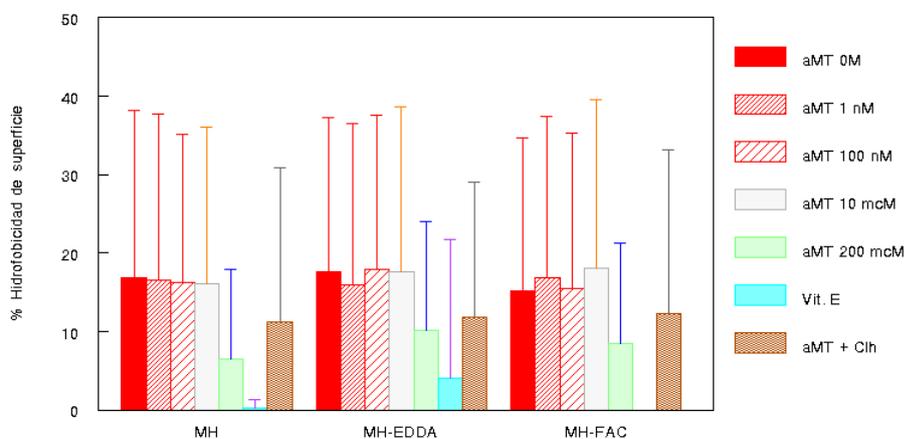


Figura 8.13. Representación de los % de hidrofobicidad media de *Escherichia coli* en medio MH, MH-EDDA y MH-FAC.

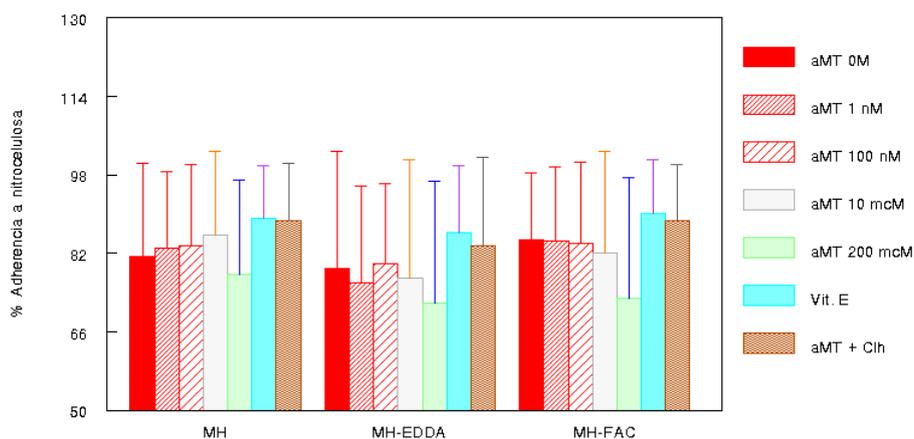


Figura 8.14. Representación de los % de adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* en medio MH, MH-EDDA y MH-FAC.

Tabla 8.14.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton con EDDA (MH-EDDA); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	79/57	8,7/8,1	9/7	-0,56 (0,56)
Sin aMT/aMT 100 nM	61/92	8,7/9,2	7/10	-0,73 (0,46)
Sin aMT/aMT 10 µM	65/55	8,1/7,8	8/7	-0,28 (0,77)
Sin aMT/aMT 200 µM	91/29	8,2/7,2	11/4	-1,76 (0,07)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	106/95	9,64/9,29	11/7	-0,89 (0,37)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	59/77	8,4/8,5	9/7	-0,46 (0,64)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	86/50	9,5/7,1	9/7	-0,93 (0,35)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	75/61	8,3/8,7	9/7	-0,36 (0,71)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	96/40	8,7/8	11/5	-1,44 (0,14)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	77/14	7,7/4,6	10/3	-2,20 (0,02)
Sin aMT/Vitamina E	93/12	7,1/12	13/1	-2,54 (0,01)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	111/42	10,1/7	11/6	-1,63 (0,1)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	65/55	6,5/11	10/5	-0,28 (0,77)
aMT 200 µM/Vitamina E	66/12	6/12	11/1	-2,11 (0,03)

Tabla 8.15.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton con citrato amónico ferroso (MH-FAC); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	46/90	11,5/7,5	4/12	-1,13 (0,25)
Sin aMT/aMT 100 nM	53,5/51,5	7,6/7,3	7/7	-0,06 (0,95)
Sin aMT/aMT 10 µM	28/63	5,6/7,8	5/8	-1,22 (0,22)
Sin aMT/aMT 200 µM	61/17	7,6/4,2	8/4	-1,72 (0,08)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	109/44	8,3/11	13/4	-1,53 (0,12)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	77/59	8,5/8,4	9/7	-0,46 (0,64)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	116/20	8,3/10	14/2	-2,48 (0,01)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	33/58	5,5/8,3	6/7	-0,87 (0,38)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	88/17	8/5,6	11/3	-2,23 (0,02)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	78/13	7,8/4,3	10/3	-2,27 (0,02)
Sin aMT/Vitamina E	78/0	6,5/0	12/0	-3,06 (0,002)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	77/28	7,7/7	10/4	-1,54 (0,12)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	33/58	6,6/7,25	5/8	-0,87 (0,38)
aMT 200 µM/Vitamina E	45/0	5/0	9/0	-2,66 (0,008)

Al suplementar el medio de cultivo (MH) con citrato amónico-ferroso (Tabla 8.15), la hidrofobicidad de superficie media de *Escherichia coli* incubada con vitamina E continúa siendo muy inferior de la observada en las otras situaciones; en concreto, la incubación con aMT 200 μM también disminuye la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*, aunque menos que la vitamina E. Al comparar la hidrofobicidad de *Escherichia coli* en aMT 200 μM y aMT 200 μM + cloranfenicol a dosis subletales, no observamos diferencias significativas.

Comparación de la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli*.

En la Tabla 8.16 se muestran los resultados de la comparación de los porcentajes de adherencia a la nitrocelulosa por *Escherichia coli* incubada en medio MH con aMT a una concentración 200 μM origina una disminución estadísticamente significativa en los porcentajes de adherencia a la nitrocelulosa, a diferencia de la incubación con vitamina E que la aumenta. Al adicionar aMT + cloranfenicol al medio de cultivo se revierten en parte las modificaciones de la adherencia a la nitrocelulosa que describimos para *Escherichia coli* incubado con aMT 200 μM sola. La comparación de la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubado sin aMT o con vitamina E no permite observar diferencias estadísticamente significativas, por lo que *a priori* podemos deducir que la vitamina E ejerce pocas modificaciones sobre la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada en MH.

Tabla 8.16.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton (MH); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	118/158	13, /11,3	9/14	-0,60 (0,54)
Sin aMT/aMT 100 nM	108/168	10,8/12,9	10/13	-0,91 (0,36)
Sin aMT/aMT 10 μM	101/175	11,2/12,5	9/14	-1,12 (0,26)
Sin aMT/aMT 200 μM	168/108	12/12	14/9	-0,91 (0,36)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	120/156	12/12	10/13	-0,54 (0,58)
aMT 1 nM/aMT 10 μM	92/184	10,2/13,1	9/14	-1,39 (0,16)
aMT 1 nM/aMT 200 μM	173/103	13,3/10,3	13/10	-1,06 (0,28)
aMT 100 nM/aMT 10 μM	76/200	10,8/12,5	7/16	-1,88 (0,06)
aMT 100 nM/aMT 200 μM	186/90	13,3/10	14/9	-1,46 (0,14)
aMT 10 μM /aMT 200 μM	213/63	14,2/7,8	15/8	-2,28 (0,02)
Sin aMT/Vitamina E	85/191	10,6/12,7	8/15	-1,61 (0,1)
Sin aMT/aMT 200 μM + Chl	91/185	10,1/13,2	9/14	-1,43 (0,15)
aMT 200 μM / aMT 200 μM + Chl	54/222	10,8/12,3	5/18	-2,55 (0,01)
aMT 200 μM /Vitamina E	58/218	9,6/12,8	6/17	-2,43 (0,01)

Tabla 8.17.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton con EDDA (MH-EDDA); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	127/104	11,5/10,4	11/10	-0,4 (0,68)
Sin aMT/aMT 100 nM	156/120	12/12	13/10	-0,54 (0,58)
Sin aMT/aMT 10 µM	156/120	14/10	11/12	-0,54 (0,58)
Sin aMT/aMT 200 µM	162/69	12,4/8,6	13/8	-1,61 (0,10)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	116/137	8,9/15,2	13/9	-0,34 (0,73)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	120/156	13,3/11,1	9/14	-0,54 (0,58)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	161,5/114,5	13,4/10,4	12/11	-0,71 (0,47)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	135/141	11,2/12,8	12/11	-0,09 (0,92)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	181/95	13,9/9,5	13/10	-1,30 (0,19)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	173/103	13,3/10,3	13/10	-1,06 (0,28)
Sin aMT/Vitamina E	102/174	10,2/13,4	10/13	-1,09 (0,27)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	139/137	11,5/12,4	12/11	-0,03 (0,97)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	67/209	8,3/13,9	8/15	-2,16 (0,03)
aMT 200 µM/Vitamina E	42/234	10,5/12,3	4/19	-2,92 (0,004)

La adición de un quelante del hierro al medio de cultivo (Tabla 8.17) tiene un doble efecto sobre el metabolismo de la bacteria, por un lado el de restringir un elemento necesario para el normal crecimiento del microorganismo por intervenir en multitud de procesos enzimáticos, por otro lado disminuir la generación de radicales libres relacionados con la presencia de hierro en el entorno del microorganismo. La adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada con aMT disminuye con la concentración creciente de aMT; sin embargo, la disminución de la adherencia resulta inhibida con el cloranfenicol a dosis subletales, que inhibe la síntesis proteica del microorganismo. No observamos diferencias entre la adherencia a la nitrocelulosa de las bacterias incubadas con vitamina E y aquellas incubadas sin aMT.

En la Tabla 8.18 se muestran los resultados del test de comparación de la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* tras añadir un suplemento de hierro al medio de cultivo. Observamos que no existen diferencias significativas entre los valores medios de las muestras incubadas sin aMT y con vitamina E; sí encontramos diferencias significativas entre las muestras incubadas con aMT 200 µM y sin aMT. Al adicionar cloranfenicol se anula el efecto descrito para las muestras incubadas con aMT 200 µM; este hecho podría implicar a la síntesis proteica “de novo” en los cambios observados en la adherencia a la nitrocelulosa al incubar con aMT 200 µM.

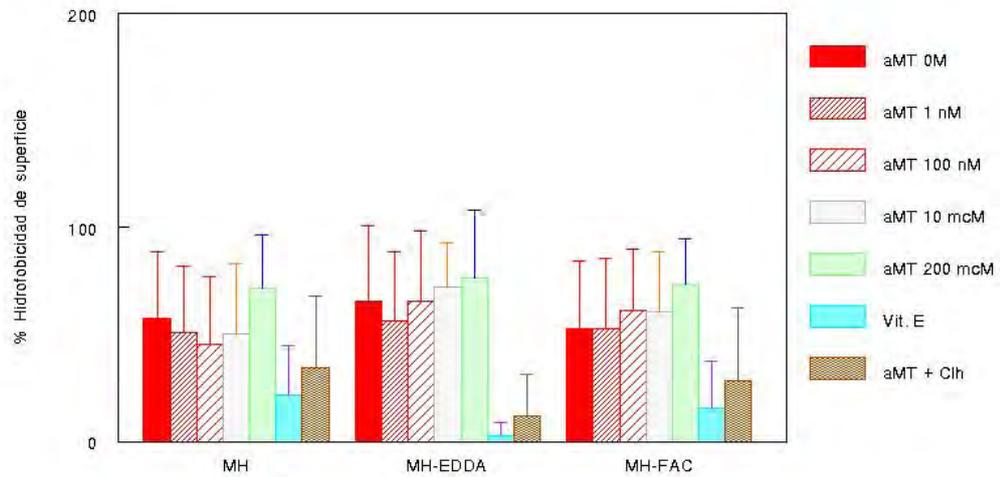


Figura 8.15. Representación de los % de hidrofobicidad media de *Neisseria meningitidis* en medio MH, MH-EDDA y MH-FAC.

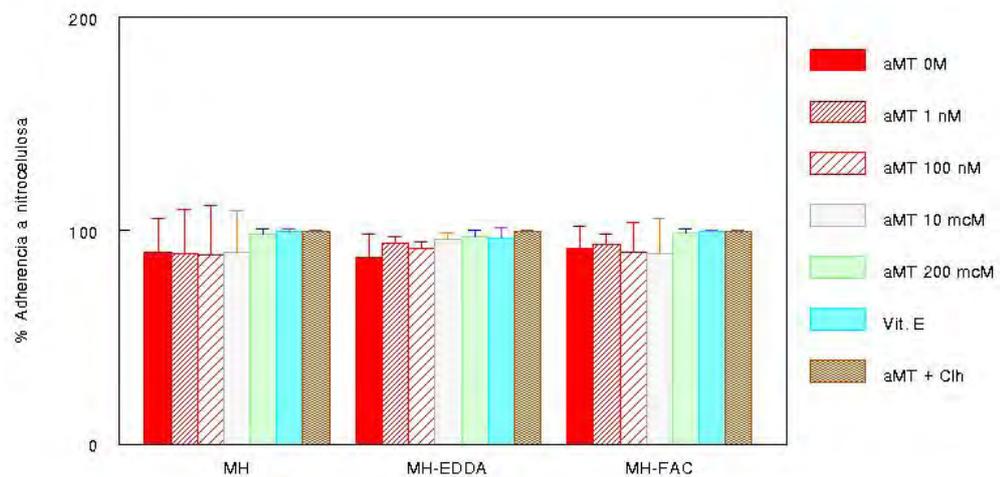


Figura 8.16. Representación de los % de adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* en medio MH, MH-EDDA y MH-FAC.

Tabla 8.18.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada en medio Müller-Hinton con citrato amónico ferroso (MH-FAC); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	139/137	12,6/11,4	11/12	-0,03 (0,97)
Sin aMT/aMT 100 nM	168/108	10,5/15,4	16/7	-0,91 (0,36)
Sin aMT/aMT 10 µM	158/118	12,1/11,8	13/10	-0,61 (0,54)
Sin aMT/aMT 200 µM	226/50	12,5/10	18/5	-2,67 (0,007)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	181/95	12,9/10,5	14/9	-1,31 (0,19)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	153/123	11,7/12,3	13/10	-0,45 (0,64)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	230/46	14,3/6,5	16/7	-2,80 (0,005)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	124/152	12,4/11,6	10/13	-0,42 (0,67)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	206/70	13,7/8,7	15/8	-2,06 (0,03)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	202/74	13,4/9,2	15/8	-1,94 (0,052)
Sin aMT/Vitamina E	88/188	8,8/14,4	10/13	-1,52 (0,12)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	121/155	10/14	12/11	-0,51 (0,60)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	44/232	7,3/13,6	6/17	-2,86 (0,004)
aMT 200 µM/Vitamina E	41/235	6,8/13,8	6/17	-2,95 (0,003)

Comparación de la hidrofobicidad de superficie de Neisseria meningitidis.

Las Tablas 8.19 a 8.21 muestran los resultados del test de comparación de Wilcoxon entre las hidrofobicidades de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada con distintas concentraciones de aMT. Independientemente de la concentración de hierro en el medio de cultivo los resultados permiten afirmar la existencia de una disminución de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* cuando se incuba con vitamina E. La aMT induce un incremento progresivo de la hidrofobicidad de superficie, que únicamente es estadísticamente significativo con concentraciones de aMT del rango de 200 µM.; sin embargo, la suplementación del medio de cultivo con cloranfenicol a dosis subletales revierte el efecto observado por la aMT 200 µM e incluso disminuye la hidrofobicidad de superficie de forma estadísticamente significativa por debajo de la hidrofobicidad observada en *Neisseria meningitidis* incubada sin aMT. Las modificaciones de hidrofobicidad de superficie observadas para *Neisseria meningitidis* incubada en MH-EDDA y MH-FAC son superponibles a las comentadas hasta aquí.

Tabla 8.19.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton (MH); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos (+/-)	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	17/4	3,4/4	1/5	-1,36 (0,17)
Sin aMT/aMT 100 nM	14/7	3,5/3,5	2/4	-0,73 (0,46)
Sin aMT/aMT 10 µM	10/11	3,3/3,6	3/3	-0,10 (0,91)
Sin aMT/aMT 200 µM	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	12/9	4/3	3/3	-0,31 (0,75)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	9/12	3/4	3/3	-0,31 (0,75)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	8/13	2,6/4,3	3/3	-0,52 (0,60)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	2/19	2/3,8	5/1	-1,78 (0,07)
Sin aMT/Vitamina E	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	19/2	3,8/2	1/5	-1,78 (0,07)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
aMT 200 µM/Vitamina E	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)

Tabla 8.20.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton con EDDA (MH-EDDA); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos (+/-)	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	19/2	3,8/2	1/5	-1,78 (0,07)
Sin aMT/aMT 100 nM	10/11	3,3/3,6	3/3	-0,10 (0,91)
Sin aMT/aMT 10 µM	8/13	2,6/4,3	3/3	-0,52 (0,60)
Sin aMT/aMT 200 µM	9/12	4,5/3	4/2	-0,31 (0,75)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	1/20	4/1	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	1/20	4/1	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	9/12	3/4	3/3	-1,31 (0,75)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	7/14	3,5/3,5	4/2	-0,73 (0,46)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	6/15	3/3	4/2	-0,94 (0,34)
Sin aMT/Vitamina E	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
aMT 200 µM/Vitamina E	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)

Tabla 8.21.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton con citrato amónico ferroso (MH-FAC); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos (+/-)	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	11/10	3,6/3,3	3/3	-0,10 (0,91)
Sin aMT/aMT 100 nM	4/17	2/4,2	4/2	-1,36 (0,17)
Sin aMT/aMT 10 µM	3/18	1,5/4,5	4/2	-1,57 (0,11)
Sin aMT/aMT 200 µM	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	3/18	3/3,6	5/1	-1,57 (0,11)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	5/16	2,5/4	4/2	-1,15 (0,24)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	7/14	3,5/3,5	4/2	-0,73 (0,46)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
Sin aMT/Vitamina E	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)
aMT 200 µM/Vitamina E	21/0	3,5/0	0/6	-2,20 (0,02)

Comparación de la adherencia de *Neisseria meningitidis* a la nitrocelulosa.

La adherencia a filtros de nitrocelulosa por *Neisseria meningitidis*, sólo se incrementa significativamente en presencia de aMT cuando suplementamos el medio de cultivo con hierro, en concreto observamos diferencias estadísticamente significativas al incubar con aMT a una concentración de 200 µM. En medio MH y MH-EDDA sólo observamos diferencias estadísticamente significativas entre la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada sin aMT e incubada con aMT 200 µM + cloranfenicol a concentraciones subinhibitorias. En medio de cultivo MH-FAC observamos diferencias significativas en la adherencia a filtros de nitrocelulosa entre *Neisseria meningitidis* incubada con vitamina E y sin ella; la incubación con aMT 200 µM + cloranfenicol induce un aumento de la adherencia a filtros similar a la obtenida tras incubación con vitamina E; de hecho no obtenemos diferencias significativas entre adherencias a filtros al comparar *Neisseria meningitidis* incubada con vitamina E y aMT + cloranfenicol, exista o no suplementación con hierro en el medio de cultivo.

Tabla 8.22.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton (MH); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos (+/-)	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	6/15	6/3	5/1	-0,94 (0,34)
Sin aMT/aMT 100 nM	7/14	3,5/3,5	4/2	-0,73 (0,46)
Sin aMT/aMT 10 µM	8/13	4/3,2	4/2	-0,52 (0,60)
Sin aMT/aMT 200 µM	4/17	4/3,4	5/1	-1,36 (0,17)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	12/9	4/3	3/3	-0,31 (0,75)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	5/16	2,5/4	4/2	-1,15 (0,24)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	5/16	2,5/4	4/2	-1,15 (0,24)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	9/12	3/4	3/3	-0,31 (0,75)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	6/15	3/3,7	4/2	-0,94 (0,34)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	5/16	5/3,2	5/1	-1,15 (0,24)
Sin aMT/Vitamina E	2/19	2/3,8	5/1	-1,78 (0,07)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	0/3	0/1,5	2/0	-1,34 (0,18)
aMT 200 µM/Vitamina E	1/2	1/2	1/1	-0,44 (0,65)

Tabla 8.23.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton con EDDA (MH-EDDA); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos (+/-)	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	5/16	2,5/4	4/2	-1,15 (0,24)
Sin aMT/aMT 100 nM	5/16	2,5/4	4/2	-1,15 (0,24)
Sin aMT/aMT 10 µM	3/18	3/3,6	5/1	-1,57 (0,11)
Sin aMT/aMT 200 µM	5/16	2,5/4	4/2	-1,15 (0,24)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	14/7	4,6/2,3	3/3	-0,73 (0,46)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	2/19	2/3,8	5/1	-1,78 (0,07)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	4/17	2/3,8	4/2	-1,36 (0,17)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	3/18	3/3,6	5/1	-1,57 (0,11)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	9/12	3/4	3/3	-0,31 (0,75)
Sin aMT/Vitamina E	3/18	3/3,6	5/1	-1,57 (0,11)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	1/9	1/3	3/1	-1,46 (0,14)
aMT 200 µM/Vitamina E	8/7	2,6/3,5	2/3	-0,13 (0,89)

Tabla 8.24.

Test de comparación de Wilcoxon para datos pareados de la adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada en medio Müller-Hinton con citrato amónico ferroso (MH-FAC); sin aMT vs distintas concentraciones de melatonina, vitamina E y melatonina + cloranfenicol (Chl).

	Suma de rangos	Rango promedio	Número de casos (+/-)	Z (p)
Sin aMT/aMT 1 nM	10/11	3,3/3,6	3/3	-0,10 (0,91)
Sin aMT/aMT 100 nM	6/15	6/3	5/1	-0,94 (0,34)
Sin aMT/aMT 10 µM	9/12	4,5/3	5/1	-0,31 (0,75)
Sin aMT/aMT 200 µM	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
aMT 1 nM/aMT 100 nM	9/12	3/4	3/3	-0,31 (0,75)
aMT 1 nM/aMT 10 µM	10/11	5/2,7	4/2	-0,10 (0,91)
aMT 1 nM/aMT 200 µM	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
aMT 100 nM/aMT 10 µM	11/10	5,5/2,5	4/2	-0,10 (0,91)
aMT 100 nM/aMT 200 µM	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
aMT 10 µM/aMT 200 µM	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
Sin aMT/Vitamina E	0/21	0/3,5	6/0	-2,20 (0,02)
Sin aMT/aMT 200 µM + Chl	1/20	1/4	5/1	-1,99 (0,04)
aMT 200 µM/ aMT 200 µM + Chl	1/2	1/2	1/1	-0,44 (0,65)
aMT 200 µM/Vitamina E	3/3	1,5/3	1/2	0 (1)

Comparación de la influencia del contenido de hierro en el medio de cultivo sobre la hidrofobicidad de superficie de Escherichia coli y Neisseria meningitidis.

Para este análisis utilizamos test no paramétricos que permiten comparar varias variables relacionadas; el fundamento del análisis del test de Friedman se desarrolla en el capítulo de Material y Métodos.

La diferente concentración de hierro del medio de cultivo no parece ser un factor decisivo a la hora de explicar la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*; en las Tablas que siguen hemos comparado las hidrofobicidades de superficie de *Escherichia coli* incubada en presencia de cada concentración de aMT estudiada, vitamina E o aMT + cloranfenicol. Se muestran los valores de los rangos promedio de cada distribución.

La hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* se muestra significativamente inferior cuando *Neisseria meningitidis* se cultiva en presencia de una concentración estándar de hierro (medio Müller-Hinton) y aMT a concentraciones de 10 µM. Con el resto de las concentraciones de aMT no observamos diferencias significativas en la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada en presencia de concentraciones de hierro diferentes en el medio de cultivo.

Tabla 8.25.

Resultados del análisis del test de Friedman sobre la influencia del contenido de hierro del medio de cultivo Müeller-Hinton sobre la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*.

	Rango promedio MH- EDDA	Rango promedio MH	Rango promedio MH-FAC	χ^2	gl	p
Sin aMT	2,17	2,00	1,83	2,13	2	0,34
aMT 1 nM	2,11	1,89	2,00	0,74	2	0,68
aMT 100 nM	2,22	1,85	1,93	1,59	2	0,27
aMT 10 μ M	1,96	1,96	2,09	0,46	2	0,79
aMT 200 μ M	2,11	1,91	1,98	0,85	2	0,65
aMT + Chl	2,17	1,89	1,93	1,66	2	0,43
Vitamina E	2,07	2,00	1,93	2,00	2	0,36

Tabla 8.26.

Resultados del análisis del test de Friedman sobre la influencia del contenido de hierro del medio de cultivo Müeller-Hinton sobre la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis*.

	Rango promedio MH- EDDA	Rango promedio MH	Rango promedio MH-FAC	χ^2	gl	p
Sin aMT	2,33	1,67	2,00	1,33	2	0,51
aMT 1 nM	2,17	1,50	2,33	2,33	2	0,31
aMT 100 nM	2,67	1,33	2,00	5,33	2	0,06
aMT 10 μ M	2,67	1,17	2,17	7,00	2	0,03
aMT 200 μ M	2,50	1,50	2,00	3,00	2	0,22
aMT + Chl	1,50	2,17	2,33	3,50	2	0,17
Vitamina E	1,50	2,50	2,00	4,50	2	0,10

Comparación de la influencia del contenido de hierro en el medio de cultivo sobre la adherencia a la nitrocelulosa de Escherichia coli y Neisseria meningitidis.

La diferente concentración de hierro del medio de cultivo no parece ser un factor decisivo a la hora de explicar la adherencia a los filtros de nitrocelulosa en *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*; en la Tabla que sigue hemos comparado la adherencia a la nitrocelulosa de estos microorganismos incubados en presencia de cada concentración de aMT estudiada, vitamina E o aMT + cloranfenicol; tan solo cuando incubamos *Escherichia coli* con aMT 1 nM observamos un porcentaje de adherencia a la nitrocelulosa estadísticamente inferior en el cultivo MH-EDDA. *Neisseria meningitidis* no muestra diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de adherencia a la nitrocelulosa en función de la concentración de hierro del medio de cultivo.

Tabla 8.27.

Resultados del análisis del test de Friedman. Influencia del contenido de hierro del medio de cultivo (Müeller-Hinton) sobre la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli*.

	Rango promedio MH- EDDA	Rango promedio MH	Rango promedio MH-FAC	χ^2	gl	p
Sin aMT	1,67	2,09	2,24	3,97	2	0,13
aMT 1 nM	1,46	2,26	2,28	10,3	2	0,006
aMT 100 nM	1,70	2,35	1,96	5,00	2	0,07
aMT 10 μ M	1,67	2,09	2,24	3,97	2	0,13
aMT 200 μ M	1,76	1,96	2,28	3,23	2	0,19
aMT + Chl	1,83	2,00	2,17	1,39	2	0,50
Vitamina E	1,74	2,04	2,22	2,69	2	0,26

Tabla 8.28.

Resultados del análisis del test de Friedman. Influencia del contenido de hierro del medio de cultivo (Müeller-Hinton) sobre la adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis*.

	Rango promedio MH- EDDA	Rango promedio MH	Rango promedio MH-FAC	χ^2	gl	p
Sin aMT	1,50	1,83	2,67	4,33	2	0,11
aMT 1 nM	1,67	2,50	1,83	2,33	2	0,31
aMT 100 nM	1,67	2,00	2,33	1,33	2	0,51
aMT 10 μ M	1,83	2,17	2,00	0,33	2	0,84
aMT 200 μ M	1,67	2,08	2,25	2,00	2	0,36
aMT + Chl	2,00	1,92	2,08	0,28	2	0,86
Vitamina E	1,42	2,33	2,25	4,35	2	0,11

8.6.2. Estudio de correlación “ r_s ” de Spearman.

Se puede demostrar que para cualquier conjunto de datos, r_s se encuentra entre +1 y -1 y en consecuencia asignar a la asociación entre dos variables un coeficiente que represente la intensidad con que los valores de una variable (x) se aproximan a los de otra variable (y). Este método estadístico de indudable utilidad tiene no obstante algunos inconvenientes ya que puede verse influido por la existencia de valores extremos que fuerzan una relación aparente más intensa, sin que exista en realidad un paralelismo entre los valores de las variables x e y. Por tanto como continuación a esta

herramienta estadística y previa normalización de las variables se hace necesario realizar un estudio de regresión que más tarde comentaremos. Seguidamente presentamos los valores de correlación entre la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa en microorganismos incubados con concentraciones diferentes de hierro y diferentes concentraciones de melatonina.

Tabla 8.29.

Resultados del estudio de correlación r de Spearman entre la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada sin aMT y distintas concentraciones de hierro, con la hidrofobicidad de superficie obtenida tras incubación con aMT a distintas concentraciones y vitamina E.

	EDDA-MH Sin aMT	MH Sin aMT	FAC-MH Sin aMT
aMT 1 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,76$; $p=0,000$	$r_s=0,67$; $p=0,000$	$r_s=0,59$; $p=0,003$
MH	$r_s=0,83$; $p=0,000$	$r_s=0,88$; $p=0,000$	$r_s=0,78$; $p=0,000$
FAC-MH	$r_s=0,81$; $p=0,000$	$r_s=0,91$; $p=0,000$	$r_s=0,85$; $p=0,000$
aMT 100 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,79$; $p=0,000$	$r_s=0,84$; $p=0,000$	$r_s=0,75$; $p=0,000$
MH	$r_s=0,68$; $p=0,000$	$r_s=0,89$; $p=0,000$	$r_s=0,84$; $p=0,000$
FAC-MH	$r_s=0,65$; $p=0,000$	$r_s=0,85$; $p=0,000$	$r_s=0,82$; $p=0,000$
aMT 10 μM			
EDDA-MH	$r_s=0,79$; $p=0,000$	$r_s=0,75$; $p=0,000$	$r_s=0,78$; $p=0,000$
MH	$r_s=0,72$; $p=0,000$	$r_s=0,90$; $p=0,000$	$r_s=0,86$; $p=0,000$
FAC-MH	$r_s=0,76$; $p=0,000$	$r_s=0,93$; $p=0,000$	$r_s=0,88$; $p=0,000$
aMT 200 μM			
EDDA-MH	$r_s=0,58$; $p=0,003$	$r_s=0,64$; $p=0,001$	$r_s=0,73$; $p=0,000$
MH	$r_s=0,27$; $p=0,212$	$r_s=0,33$; $p=0,124$	$r_s=0,39$; $p=0,065$
FAC-MH	$r_s=0,40$; $p=0,056$	$r_s=0,64$; $p=0,001$	$r_s=0,73$; $p=0,000$
aMT 200 μM + Chl			
EDDA-MH	$r_s=0,42$; $p=0,046$	$r_s=0,43$; $p=0,038$	$r_s=0,43$; $p=0,036$
MH	$r_s=0,32$; $p=0,127$	$r_s=0,57$; $p=0,004$	$r_s=0,53$; $p=0,009$
FAC-MH	$r_s=0,37$; $p=0,075$	$r_s=0,71$; $p=0,000$	$r_s=0,66$; $p=0,001$
Vitamina E			
EDDA-MH	$r_s=0,35$; $p=0,093$	$r_s= -$ $p= -$	$r_s=0,23$; $p=0,279$
MH	$r_s=-0,23$; $p=0,287$	$r_s=0,09$; $p=0,652$	$r_s=0,13$; $p=0,536$
FAC-MH	$r_s= -$ $p= -$	$r_s=0,27$; $p=0,197$	$r_s= -$ $p= -$

A diferencia de lo que suele ocurrir en otro tipo de estudios, nos interesa en el análisis de correlación del presente estudio, analizar qué grupos de variables no están estadísticamente correlacionadas, ello podría indicar que se han introducido modificaciones en el medio de cultivo que hacen a la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* diferente según cual sea el medio de cultivo considerado. Observamos que la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada con aMT 200 μ M en medio MH no se correlaciona con la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* sin aMT; similares observaciones podemos hacer en referencia a la hidrofobicidad de *Escherichia coli* incubada sin aMT en medio MH-EDDA y la hidrofobicidad de

Escherichia coli incubada con aMT + cloranfenicol. Por su parte las hidrofobicidades de superficie de *Escherichia coli* incubada con y sin vitamina E, tampoco se correlacionan significativamente; al igual que *Escherichia coli* incubado con vitamina E y con aMT 200 μ M, lo que podría sugerir efectos diferentes de estas sustancias sobre la hidrofobicidad de superficie de este microorganismo.

Tabla 8.30.

Resultados del estudio de correlación r de Spearman entre la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada sin aMT y distintas concentraciones de hierro, con la adherencia a filtros de nitrocelulosa obtenida tras incubación con aMT a distintas concentraciones y vitamina E.

	EDDA-MH Sin aMT	MH Sin aMT	FAC-MH Sin aMT
aMT 1 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,47$; $p=0,023$	$r_s=0,66$; $p=0,001$	$r_s=0,69$; $p=0,000$
MH	$r_s=0,54$; $p=0,008$	$r_s=0,76$; $p=0,000$	$r_s=0,77$; $p=0,000$
FAC-MH	$r_s=0,68$; $p=0,000$	$r_s=0,93$; $p=0,000$	$r_s=0,83$; $p=0,000$
aMT 100 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,44$; $p=0,032$	$r_s=0,56$; $p=0,005$	$r_s=0,59$; $p=0,003$
MH	$r_s=0,37$; $p=0,076$	$r_s=0,55$; $p=0,006$	$r_s=0,56$; $p=0,005$
FAC-MH	$r_s=0,37$; $p=0,077$	$r_s=0,61$; $p=0,002$	$r_s=0,69$; $p=0,000$
aMT 10 μM			
EDDA-MH	$r_s=0,59$; $p=0,003$	$r_s=0,72$; $p=0,000$	$r_s=0,72$; $p=0,000$
MH	$r_s=0,40$; $p=0,055$	$r_s=0,57$; $p=0,005$	$r_s=0,69$; $p=0,000$
FAC-MH	$r_s=0,58$; $p=0,003$	$r_s=0,72$; $p=0,000$	$r_s=0,73$; $p=0,000$
aMT 200 μM			
EDDA-MH	$r_s=0,41$; $p=0,049$	$r_s=0,40$; $p=0,058$	$r_s=0,39$; $p=0,064$
MH	$r_s=0,29$; $p=0,177$	$r_s=0,31$; $p=0,139$	$r_s=0,37$; $p=0,077$
FAC-MH	$r_s=0,33$; $p=0,121$	$r_s=0,61$; $p=0,002$	$r_s=0,49$; $p=0,016$
aMT 200 μM + Chl			
EDDA-MH	$r_s=0,33$; $p=0,117$	$r_s=0,36$; $p=0,089$	$r_s=0,38$; $p=0,073$
MH	$r_s=0,15$; $p=0,491$	$r_s=0,33$; $p=0,117$	$r_s=0,36$; $p=0,085$
FAC-MH	$r_s=0,23$; $p=0,282$	$r_s=0,32$; $p=0,130$	$r_s=0,34$; $p=0,106$
Vitamina E			
EDDA-MH	$r_s=0,27$; $p=0,203$	$r_s=0,41$; $p=0,047$	$r_s=0,37$; $p=0,075$
MH	$r_s=0,16$; $p=0,464$	$r_s=0,26$; $p=0,220$	$r_s=-0,38$; $p=0,073$
FAC-MH	$r_s=0,17$; $p=0,415$	$r_s=0,36$; $p=0,087$	$r_s=0,33$; $p=0,119$

En lo referente al estudio de correlación de adherencia a filtros de nitrocelulosa por *Escherichia coli* (Tabla 8.30), no encontramos correlaciones estadísticamente significativas entre *Escherichia coli* incubado en medio MH, MH-EDDA y MH-FAC sin aMT y la adherencia a filtros obtenida tras incubación con aMT 200 μ M + cloranfenicol o vitamina E. Solamente en medios de cultivo suplementados con hierro observamos una fuerte correlación entre la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli* incubada sin aMT y con aMT a concentraciones 200 μ M.

Tabla 8.31.

Resultados del estudio de correlación r de Spearman entre la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada sin aMT y distintas concentraciones de hierro, con la hidrofobicidad de superficie obtenida tras incubación con aMT a distintas concentraciones y vitamina E.

	EDDA-MH Sin aMT	MH Sin aMT	FAC-MH Sin aMT
aMT 1 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,88$; $p=0,019$	$r_s=0,60$; $p=0,208$	$r_s=0,77$; $p=0,072$
MH	$r_s=0,54$; $p=0,266$	$r_s=0,82$; $p=0,042$	$r_s=0,94$; $p=0,005$
FAC-MH	$r_s=0,54$; $p=0,266$	$r_s=0,82$; $p=0,042$	$r_s=0,94$; $p=0,005$
aMT 100 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,77$; $p=0,072$	$r_s=0,37$; $p=0,468$	$r_s=0,54$; $p=0,266$
MH	$r_s=0,77$; $p=0,072$	$r_s=0,48$; $p=0,329$	$r_s=0,54$; $p=0,256$
FAC-MH	$r_s=0,42$; $p=0,397$	$r_s=0,94$; $p=0,005$	$r_s=1,00$; $p=0,000$
aMT 10 μM			
EDDA-MH	$r_s=0,65$; $p=0,156$	$r_s=0,54$; $p=0,266$	$r_s=0,77$; $p=0,072$
MH	$r_s=0,77$; $p=0,072$	$r_s=0,65$; $p=0,156$	$r_s=0,82$; $p=0,042$
FAC-MH	$r_s=0,77$; $p=0,072$	$r_s=0,65$; $p=0,156$	$r_s=0,82$; $p=0,042$
aMT 200 μM			
EDDA-MH	$r_s=0,37$; $p=0,468$	$r_s=0,94$; $p=0,005$	$r_s=0,88$; $p=0,019$
MH	$r_s=0,82$; $p=0,042$	$r_s=0,60$; $p=0,208$	$r_s=0,65$; $p=0,156$
FAC-MH	$r_s=0,54$; $p=0,266$	$r_s=0,82$; $p=0,042$	$r_s=0,94$; $p=0,005$
aMT 200 μM + Chl			
EDDA-MH	$r_s=0,30$; $p=0,305$	$r_s=0,50$; $p=0,305$	$r_s=0,50$; $p=0,305$
MH	$r_s=0,75$; $p=0,321$	$r_s=0,49$; $p=0,321$	$r_s=0,63$; $p=0,173$
FAC-MH	$r_s=0,94$; $p=0,439$	$r_s=0,39$; $p=0,439$	$r_s=0,51$; $p=0,295$
Vitamina E			
EDDA-MH	$r_s=0,39$; $p=0,441$	$r_s=-0,39$; $p=0,441$	$r_s=-0,39$; $p=0,441$
MH	$r_s=0,81$; $p=0,461$	$r_s=0,37$; $p=0,461$	$r_s=0,46$; $p=0,354$
FAC-MH	$r_s=0,69$; $p=0,389$	$r_s=0,43$; $p=0,389$	$r_s=0,69$; $p=0,125$

En *Neisseria meningitidis*, al igual que comentábamos para *Escherichia coli* no observamos coeficientes de correlación estadísticamente significativos entre la hidrofobicidad de superficie obtenida tras incubación sin aMT y con vitamina E. En medio de cultivo suplementado con hierro encontramos alto nivel de significación estadística entre la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada sin aMT y aMT 200 μ M; coeficientes de correlación que no son significativos estadísticamente cuando añadimos cloranfenicol al medio de cultivo conteniendo aMT 200 μ M. La hidrofobicidad de superficie observada en *Neisseria meningitidis* tras adición de EDDA al medio de cultivo, sin aMT no se correlaciona estadísticamente con la hidrofobicidad observada tras incubación con concentraciones crecientes de aMT (columna 1 de la Tabla 8.31).

Tabla 8.32.

Resultados del estudio de correlación r de Spearman entre la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada sin aMT y distintas concentraciones de hierro, con la adherencia a filtros de nitrocelulosa obtenida tras incubación con aMT a distintas concentraciones y vitamina E.

	EDDA-MH Sin aMT	MH Sin aMT	FAC-MH Sin aMT
aMT 1 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,39$; $p=0,042$	$r_s=0,71$; $p=0,111$	$r_s=0,54$; $p=0,266$
MH	$r_s=0,94$; $p=0,005$	$r_s=0,94$; $p=0,005$	$r_s=0,77$; $p=0,072$
FAC-MH	$r_s=0,02$; $p=0,957$	$r_s=0,31$; $p=0,544$	$r_s=-0,14$; $p=0,787$
aMT 100 nM			
EDDA-MH	$r_s=0,48$; $p=0,072$	$r_s=0,37$; $p=0,468$	$r_s=0,08$; $p=0,872$
MH	$r_s=0,77$; $p=0,072$	$r_s=0,94$; $p=0,005$	$r_s=0,60$; $p=0,208$
FAC-MH	$r_s=0,08$; $p=0,872$	$r_s=0,42$; $p=0,397$	$r_s=-0,08$; $p=0,872$
aMT 10 μ M			
EDDA-MH	$r_s=0,20$; $p=0,704$	$r_s=0,14$; $p=0,787$	$r_s=-0,25$; $p=0,623$
MH	$r_s=0,88$; $p=0,019$	$r_s=1$; $p=$	$r_s=0,71$; $p=0,111$
FAC-MH	$r_s=0,08$; $p=0,872$	$r_s=0,42$; $p=0,397$	$r_s=-0,08$; $p=0,872$
aMT 200 μ M			
EDDA-MH	$r_s=-0,88$; $p=0,021$	$r_s=-0,94$; $p=0,005$	$r_s=-0,88$; $p=0,021$
MH	$r_s=-0,67$; $p=0,140$	$r_s=-0,43$; $p=0,383$	$r_s=-0,67$; $p=0,140$
FAC-MH	$r_s=0,65$; $p=0,158$	$r_s=0,65$; $p=0,158$	$r_s=0,13$; $p=0,805$
aMT 200 μ M + Chl			
EDDA-MH	$r_s=0,13$; $p=0,805$	$r_s=0,39$; $p=0,441$	$r_s=0,39$; $p=0,441$
MH	$r_s=-0,65$; $p=0,158$	$r_s=-0,39$; $p=0,44$	$r_s=-0,65$; $p=0,158$
FAC-MH	$r_s=-0,65$; $p=0,158$	$r_s=-0,39$; $p=0,441$	$r_s=-0,65$; $p=0,158$
Vitamina E			
EDDA-MH	$r_s=0$; $p=1$	$r_s=-0,08$; $p=0,868$	$r_s=-0,05$; $p=0,912$
MH	$r_s=-0,13$; $p=0,805$	$r_s=-0,13$; $p=0,805$	$r_s=-0,13$; $p=0,805$
FAC-MH	$r_s=-0,33$; $p=0,512$	$r_s=-0,27$; $p=0,604$	$r_s=-0,16$; $p=0,749$

La adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada sin aMT en medio MH, MH-EDDA y MH-FAC se correlaciona significativamente con la observada tras incubación con aMT 200 μ M y EDDA. Al igual que lo observado con la hidrofobicidad de superficie, la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* incubada sin aMT no se correlaciona significativamente con la observada tras incubación con vitamina E, o con aMT + cloranfénicol.

8.6.3. Estudio de regresión lineal.

La principal dificultad que plantea este tipo de análisis en nuestro estudio se deriva de la imposibilidad de asumir un ajuste normalidad en la distribución. En consecuencia nos vemos obligados a normalizar las variables, para ello calculamos el valor del logaritmo neperiano (\ln) de la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa.

Influencia de la concentración de melatonina en el medio de cultivo sobre la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de Escherichia coli.

De acuerdo con las líneas generales de este estudio consideramos inicialmente como variable independiente la concentración de melatonina en el medio de cultivo y como variables dependientes el logaritmo neperiano de la hidrofobicidad de superficie y el logaritmo neperiano de la adherencia a la nitrocelulosa. Este tipo de análisis es de interés como una primera aproximación a la influencia teórica de cada variable al parámetro estudiado, en nuestro caso “hidrofobicidad de superficie” o “adherencia a la nitrocelulosa”. Sin embargo, debe considerarse que en las variables dependientes estudiadas deben imbricarse múltiples parámetros, pretender abarcarlos todos es poco menos que imposible; por ello, en este apartado desarrollaremos un análisis de regresión simple como primer paso; valoramos a continuación un ajuste por la concentración de hierro del medio de cultivo y estudiamos la interacción entre la concentración de melatonina en el medio de cultivo y la de hierro.

No observamos coeficientes de regresión estadísticamente significativos entre aMT (variable independiente) y la hidrofobicidad de superficie, normalizada mediante el cálculo de su logaritmo neperiano (ln); sin embargo, hay que destacar que estos coeficientes se encuentran próximos al límite de significación estadística. Esta situación no es diferente cuando ajustamos por el contenido de hierro del medio de cultivo (que se categorizó como: -1, medio de cultivo con quelante de hierro; 0, medio de cultivo Müeller-Hinton; y +1, medio de cultivo suplementado con hierro). Además, no encontramos interacción estadística entre aMT y el hierro del medio de cultivo.

Tabla 8.33

Regresión lineal entre la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* (normalizada como ln) y la concentración de melatonina en el medio de cultivo ajustada por el contenido de hierro del mismo.

	R²	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Modelo 1 aMT	0,019	2,99	-0,000002	0,000	1,92	0,056	NS
Modelo 2 aMT Hierro (-1, 0, +1)	0,02	2,99	-0,000002 0,042	0,000 0,095	1,90 0,44	0,056 0,65	NS
Modelo 3 aMT Hierro (-1, 0, +1) aMT x Hierro	0,023	2,99	-0,000002 0,0083 0,000001	0,000 0,10 0,000	-0,13 0,08 0,76	1,81 0,93 0,44	NS NS NS

La adherencia a la nitrocelulosa, evaluada como ln, presenta coeficientes de regresión estadísticamente significativos e inversos con la concentración de aMT; en

concreto el incremento de la concentración de aMT en el medio de cultivo en 1 μ M disminuye el ln de la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* en 0,05. El modelo 2 de regresión que se presenta en la siguiente Tabla permite comprobar el nulo beneficio del ajuste por la cantidad de hierro del medio de cultivo; así como la inexistencia de interacción entre hierro y aMT.

Tabla 8.34

Regresión lineal simple entre la adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* (normalizada como ln) y la concentración de melatonina en el medio de cultivo ajustada por el contenido de hierro del mismo.

	R ²	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Modelo 1							
aMT	0,02	4,37	-0,00005	0,000	2,63	0,009	**
Modelo 2							
aMT	0,024	4,37	-0,00005	0,000	2,64	0,009	**
Hierro (-1, 0, +1)			0,025	0,021	1,19	0,23	NS
Modelo 3							
aMT	0,16	4,37	0,00005	0,000	2,62	0,009	**
Hierro (-1, 0, +1)			0,039	0,024	1,65	0,1	NS
aMT x Hierro			-0,00003	0,000	1,27	0,20	NS

Influencia de la concentración de melatonina en el medio de cultivo sobre la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de Neisseria meningitidis.

De forma similar a lo comentado para *Escherichia coli* no observamos en *Neisseria meningitidis* coeficientes de regresión estadísticamente significativos, considerando como variable dependiente el ln de la hidrofobicidad de superficie y como variable independiente la concentración de aMT. Como puede verse en la Tabla 8.35 ajustamos la ecuación de regresión por el contenido de hierro, no observándose modificaciones en el EE, en el valor del coeficiente regresión o en su nivel de significación; se investiga la existencia de posible interacción entre estas variables, que se descarta.

La adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis*, previa normalización con el cálculo del ln, exhibe un coeficiente de regresión estadísticamente significativo con la concentración de aMT. Efecto que no se observa al intentar el ajuste por la concentración de hierro del medio de cultivo, de este hecho puede deducirse que la concentración de hierro del medio de cultivo es una variable modificadora de efecto, por tanto el ideal en estos casos es describir el efecto, no efectuar el ajuste estadístico.

Tabla 8.35

Regresión lineal entre la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* (normalizada como ln) y la concentración de melatonina en el medio de cultivo ajustada por el contenido de hierro del mismo.

	R ²	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Modelo 1							
aMT	0,04	3,82	0,0000018	0,000	1,91	0,059	NS
Modelo 2							
aMT	0,04	3,82	0,0000018	0,000	1,90	0,06	NS
Hierro (-1, 0, +1)			-0,069	0,096	-0,72	0,47	NS
Modelo 3							
aMT	0,049	3,82	0,0000018	0,000	1,89	0,061	NS
Hierro (-1, 0, +1)			-0,097	0,11	0,88	0,37	NS
aMT x Hierro			0,00000066	0,000	0,54	0,59	NS

Tabla 8.36

Regresión lineal simple entre la adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* (normalizada como ln) y la concentración de melatonina en el medio de cultivo ajustada por el contenido de hierro del mismo.

	R ²	Cte.	B	EE (B)	t	p	Nivel
Modelo 1							
aMT	0,048	4,49	0,00000047	0,000	2,11	0,038	*
Modelo 2							
aMT	0,049	4,49	0,00000046	0,000	2,10	0,039	*
Hierro (-1, 0, +1)			-0,0057	0,021	0,27	0,79	NS
Modelo 3							
aMT	0,05	4,49	0,00000046	0,000	2,09	0,04	*
Hierro (-1, 0, +1)			-0,0097	0,024	0,39	0,69	NS
aMT x Hierro			0,00000009	0,000	0,34	0,72	NS

DISCUSIÓN

9. Discusión

9.1. Consideraciones metodológicas sobre la medida de hidrofobicidad de superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa.

La capacidad de las bacterias para adherirse a las superficies está reconocida como un paso esencial en la colonización de tejidos de mamíferos, así como de otros tantos nichos ecológicos (161). Un factor importante en la determinación de la adherencia bacteriana es la naturaleza hidrofóbica de la superficie celular bacteriana y la carga eléctrica de superficie del microorganismo (70), ambos responsables de una primera fase en el proceso de adherencia, o de acercamiento de la bacteria a la superficie celular; de hecho, las interacciones hidrofóbicas se han visto implicadas en la adherencia de la bacteria a los fagocitos (162), diversos tejidos del huésped (74;163), afinidad para adsorberse con hidrocarburos (158;164), o desplazarse a una interfase agua-aire (165). Otros factores como la piliación de las bacterias y la síntesis de adhesinas específicas contribuyen a la adhesión a epitelios (166-168); si bien, estos últimos mecanismos se verían facilitados por una primera fase de acercamiento de la bacteria a la superficie epitelial.

Las características morfológicas de las bacterias pueden relacionarse con sus propiedades adherentes a superficies; en concreto, el aumento de la rugosidad descrito en diversas cepas de Salmonella es un factor que determina un incremento de las propiedades adherentes de la bacteria, a través de un incremento de la superficie bacteriana útil y por tanto de una mayor expresión de las adhesinas de superficie (164;169). Diversos autores (28;164), han sugerido que el incremento de la adherencia de las cepas rugosas puede ser debido al incremento de la hidrofobicidad de superficie, tal vez a consecuencia de una mayor superficie para expresar las moléculas hidrofóbicas.

De acuerdo con Rosenberg (5;170), el comportamiento hidrofóbico-hidrofílico de las superficies bacterianas está modulado por sustancias denominadas hidrofobinas (aumentan la hidrofobicidad) e hidrofílinas (disminuyen la hidrofobicidad), las cuales pueden coexistir en la superficie de la membrana bacteriana externa. Según esto, la adherencia se puede considerar como el fenómeno que resulta de la interacción entre dos superficies, en la que participan factores físico-químicos y biológicos (23); precisándose el contacto de la bacteria con la célula; al ser ambas superficies electronegativas se produce un fenómeno de repulsión que es neutralizado, en parte, por débiles fuerzas de atracción del tipo Van der Waals, enlaces iónicos, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas (23). La existencia en la superficie de la bacteria

de moléculas hidrofóbicas y en especial de adhesinas, que por su pequeño tamaño no están ligadas a las fuerzas de repulsión, permite neutralizar esta barrera y facilitar el contacto (70); estas interacciones hidrofóbicas que se producen han sido agrupadas por algunos autores como la teoría DLVO correspondiente a las iniciales de los autores que la postularon (teoría coloidal de DeJaquin y Landau, Verwey y Overbeek) (171). El incremento de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana lo relacionan estos autores con un incremento de la adherencia no sólo a superficies mucosas sino también a células fagocíticas (23).

Estudios realizados por Pérez y cols. (172), sobre las propiedades de superficie de cepas de bifidobacterias de origen humano muestran que la hidrofobicidad parece ser necesaria para la adhesión a las células enterocitos-like, siendo las cepas adhesivas altamente hidrofóbicas, y el grado de adherencia levemente dependiente del potencial de superficie. Estos autores (172), han estudiado las propiedades de superficie de cepas de bifidobacterias de origen humano mostrando que la hidrofobicidad parece ser necesaria para la adhesión a células tipo enterocítico, siendo las cepas adhesivas altamente hidrofóbicas y dependiendo el grado de adherencia ligeramente del potencial de superficie. Otros autores (5), observan que los cambios de la carga de superficie e hidrofobicidad de la superficie bacteriana externa están en relación con el tipo de medio de cultivo utilizado.

La capacidad de organismos bacterianos para producir una matriz polisacárida extracelular conocida como *slime* se ha relacionado con el incremento de la virulencia y las infecciones retardadas en diferentes implantes protésicos. En una biopelícula el *slime* puede proteger a la bacteria de los mecanismos de defensa del huésped, especialmente la fagocitosis por los leucocitos polimorfonucleares. Heinzelmann y cols. (16), determinaron la hidrofobicidad por cromatografía de interacción hidrofóbica en *S. epidermidis* RP62A productor de *slime* y su variante fenotípica, RP62A-NA no productora de *slime*; en estos ensayos el descenso de hidrofobicidad de RP62A sobre RP62A-NA se relaciona con una capa hidrofílica de *slime*.

En un estudio llevado a cabo por T. Saito y cols. (173), se determinó la hidrofobicidad de la superficie celular y la carga de superficie de un estreptococo oral, al adherirse a un agente antimicrobiano inmovilizado, concluyendo que la carga negativa sobre la superficie celular inhibía la adherencia al agente antimicrobiano inmovilizado, que este agente podría adsorber proteínas hidrofóbicas de la superficie celular del total de las especies bacterianas involucradas en el estudio y que la adsorción fue dependiente del grado de hidrofobicidad de sus superficies .

M.L. Marín y cols. (174), han medido la hidrofobicidad y la adhesión a sustratos sólidos, empleándose para esta determinación la adherencia bacteriana a hidrocarburos (BATH; octano y xileno), adhesión a filtros de nitrocelulosa (NCF), test de agregación de sales (SAT) y adherencia a partículas de fenil-sefaraosa (PSB). Estos autores han encontrado que la hidrofobicidad relativa de bacterias ácido-lácticas dependía notablemente del método usado, no existiendo ninguna correlación entre cualquiera de los dos SAT o BATH (octano) y fuerza de unión. Similares consideraciones se obtuvieron en anteriores estudios (175), en que se relacionaba adhesión a p-xileno y hexadecano y agregación con sales. Esta aparente disparidad entre resultados es todavía mayor cuando consideramos diferentes cepas bacterianas; a este respecto Ferreirós y

cols. (176) evaluaron la hidrofobicidad de superficie y la adherencia a células de epitelio bucal humano de *Neisseria meningitidis*, e indujeron modificaciones en estos dos parámetros con antibióticos a diversas dosis, no encontrando relaciones entre adherencia e hidrofobicidad, sin que importase el método empleado para evaluar esta última; en este estudio los efectos de los antibióticos variaban en función de la cepa, método y/o parámetros testados.

Un método simple para la medida relativa de la hidrofobicidad de superficie de las células bacterianas es el test basado en la "agregación con sales". Este método se basa en la precipitación de las células por sales como, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (177). La concentración de sales requerida para precipitar la suspensión de bacterias es una medida de su hidrofobicidad de superficie, siendo las células más hidrofóbicas las primeras en precipitar a una baja concentración de sales. Bajo este principio y como una modificación de la técnica de agregación de sales y adherencia a hidrocarburos Rosenberg, M. (159) desarrolla una modificación de la técnica original de adherencia a hidrocarburos (158), adicionando sulfato amónico a los búfferes y amplificando de esta forma la respuesta hidrofóbica de los microorganismos.

Pembrey RS y *cols.* (178), investigando sobre distintas técnicas microbiológicas, como las que son objeto del presente trabajo de Tesis Doctoral y otros protocolos de preparación celular (lavados en distintos medios, resuspensión, desecación, contacto con hidrocarburos para determinación de la hidrofobicidad, centrifugación, etc.) observan que los efectos de estos procedimientos sobre la movilidad electroforética, adhesión a sustratos sólidos, integridad estructural y viabilidad celular van en el sentido de alterar severamente las propiedades fisico-químicas de las células, de diferente forma según el procedimiento y el microorganismo que se considere. Así, ocurre una considerable disrupción de las superficies celulares cuando los microorganismos se ponen en contacto con hidrocarburos; la centrifugación a altas velocidades (15,000 x g) modifica las características celulares de superficie de forma significativa, aunque la viabilidad se afectó por este procedimiento sólo en *Escherichia coli*. Las soluciones de lavado y de resuspensión tienen igualmente influencia sobre los valores de los parámetros de la superficie celular particularmente cuando se utilizan secuencialmente soluciones con elevado contenido de sal y buffer con menor concentración de sal.

Criado y *cols.* (179), en un estudio realizado en *Neisseria meningitidis*, sobre la hidrofobicidad de superficie y adherencia a células epiteliales orales, refiere que la hidrofobicidad del meningococo no es un factor relevante en la adherencia; debemos considerar no obstante la multitud de factores (intrínsecos al huésped y de laboratorio) que pueden artefactar estas conclusiones. Pese a la teórica importancia de la hidrofobicidad de superficie en la virulencia de *Neisseria meningitidis*, no ha sido posible encontrar hasta el presente un paralelismo claro entre esta característica de superficie y las manifestaciones clínicas del microorganismo, pudiendo permanecer en la orofaringe de portadores asintomáticos o manifestarse como enfermedad con diseminación sistémica y sepsis fatal; por tanto, es obligado deducir que otros factores inherentes al huésped y no solo al microorganismo pueden estar implicados en el diferente comportamiento de *Neisseria meningitidis*.

Los componentes de fimbrias y lipopolisacáridos de superficie (LPS), importante determinante de la virulencia de *Neisseria meningitidis* (180), intervienen en la adhesión bacteriana, interaccionando no sólo con receptores específicos, sino también con receptores de tipo no específico. Por tanto, las fimbrias presentes en *Neisseria meningitidis* (igual que en *Neisseria gonorrhoeae*) median la adhesión a células superficiales mucosas de faringe. Las especies saprófitas del género *Neisseria* poseen también fimbrias, por lo cual, en la virulencia de estos microorganismos debe de haber otros mecanismos implicados, tales como algunas proteínas de membrana externa (23).

En *Neisseria meningitidis* se puede distinguir una etapa inicial de adherencia localizada mediada por pili; posteriormente se produce una dispersión con pérdida de la piliación, dando lugar a una adherencia difusa. En esta etapa, *Neisseria meningitidis* interacciona íntimamente con las células. La progresión desde la adherencia localizada a la difusa requiere la presencia del gen Pil T (proteína Pil T).

Algunos trabajos muestran cómo las bacterias adherentes parecen ser menos sensibles a los antibióticos (181), y a los sistemas naturales de defensa del huésped, como la actividad bactericida del suero y la fagocitosis (182). Algunos antimicrobianos presentan una capacidad antiadherente cuando se encuentran a concentraciones subinhibitorias (183). *Neisseria meningitidis* aislada en sujetos portadores se caracteriza por poseer alta capacidad de adherencia que disminuye al hacerse la bacteria invasiva (176).

Escherichia coli, como bacteria gramnegativa, presenta el antígeno O localizado en el lipopolisacárido situado en la membrana externa de la pared. Estos LPS poseen estructuralmente tres zonas, la más interna es el lípido A, en la zona media hay un número limitado de azúcares y en la externa una larga cadena de azúcares, que constituye el antígeno O (2).

La adherencia mediada por fimbrias, es el resultado de la interacción de puntos específicos con lugares diana en la célula epitelial mediante uniones del tipo azúcar-leptina. La zona combinante está constituida por un pequeño segmento de las subunidades proteicas de la fimbria (región amino-terminal) (23). Las fimbrias están constituidas por proteínas de 18.000 daltons que poseen una región variable y una constante. La región constante representa la zona adhesiva de la bacteria, estando cubierta la superficie de cada fimbria por estas zonas adhesivas. Parece ser que la región variable de la proteína forma un anillo alrededor de un poro, que a su vez conduciría a la zona adhesiva de la bacteria. Este poro es suficientemente grande para permitir la adherencia y a su vez pequeño para permitir la acción neutralizante de los anticuerpos (184). Los receptores de membrana para las enterobacterias suelen, en general, estar compuestos por hidratos de carbono simples como es el caso de la manosa (185), aunque en algunos casos como en la *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), los receptores están formados por hidratos de carbono complejos, polimerizados.

La posibilidad de que un microorganismo se adapte a situaciones ambientales *a priori* desfavorables, como los cambios oxidativos desenacadenados por el huésped durante la respuesta microbiana, explica algunos de los mecanismos patogénicos de las bacterias. La capacidad de neutralizar el efecto lesivo del peróxido de hidrógeno mediante la producción de catalasa sería el mecanismo más conocido. Uno de los efectos de la peroxidación lipídica de las membranas biológicas es el incremento de su

hidrofobicidad de superficie (186), este efecto resulta inhibido por la vitamina E. Resulta fácil de entender que los cambios oxidativos desencadenados por el huésped como parte de los mecanismos de defensa frente a la infección bacteriana desencadenen en la superficie bacteriana modificaciones que hagan a la bacteria más vulnerable frente a la fagocitosis, esto es incrementando la hidrofobicidad de superficie.

9.2. Consideraciones sobre la medida de hidrofobicidad de superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa en *Escherichia coli*.

Como puede apreciarse en las Tablas 8.1 a 8.12, globalmente los valores medios de hidrofobicidad de superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa obtenidos en *Escherichia coli* al incubar con o sin melatonina, melatonina + cloranfenicol o vitamina E son netamente inferiores a los observados en *Neisseria meningitidis*; además el sentido del efecto observado en la hidrofobicidad de superficie, al incubar con melatonina es contrario al observado en *Neisseria meningitidis*; características de superficie inherentes a cada germen deben ser la causa de estos resultados (187). La concentración de hierro en el medio de cultivo no modifica significativamente ni la hidrofobicidad de superficie ni la adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli*.

Como hemos tenido ocasión de comprobar en el apartado de resultados, la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* disminuye significativamente tras incubar con melatonina a concentraciones 200 mcM en medio MH al igual que el porcentaje de adherencia a la nitrocelulosa en medio FAC-MH. La adición al medio de cultivo de melatonina (200 mcM) + cloranfenicol a concentraciones subletales no determina cambios en la hidrofobicidad de superficie; este hecho puede ser indicativo de que la síntesis proteica *de novo* no interviene en el descenso de hidrofobicidad de superficie descrito con altas concentraciones de aMT. En estas mismas condiciones el porcentaje de adherencia a la nitrocelulosa aumenta significativamente cuando se incuba *Escherichia coli* en presencia de hierro, ya que la adición de un quelante de hierro al medio de cultivo (EDDA) hace disminuir el porcentaje de adherencia a la nitrocelulosa.

La vitamina E origina importantes disminuciones de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*, muy superiores a las obtenidas con aMT a concentraciones 200 mcM. El porcentaje de adherencia a los filtros de nitrocelulosa de *Escherichia coli* se incrementa significativamente al incubar el microorganismo con vitamina E; en estos casos, las modificaciones tanto en la hidrofobicidad de superficie como en la adherencia a la nitrocelulosa son más importantes cuando el medio de cultivo se ve suplementado con hierro. Diversos trabajos (97;111), proponen al hierro como iniciador de la peroxidación lipídica, que en mayor o menor grado podría ser responsable de las modificaciones de la hidrofobicidad de superficie de los microorganismos. A este respecto, nuestros hallazgos de una disminución de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*, tras incubación con vitamina E irían en este sentido. Por otro lado, el incremento de la adherencia a la nitrocelulosa al incubar con vitamina E, efecto contrapuesto al observado sobre la hidrofobicidad de superficie,

hace presuponer que el efecto antioxidante de la vitamina E preservaría a los radicales proteicos responsables de la adherencia a la nitrocelulosa de los mecanismos oxidativos, que tendrían una mayor expresión en la superficie bacteriana.

No existe concordancia entre adherencia a la nitrocelulosa e hidrofobicidad de superficie, y sólo encontramos concordancia entre ambos métodos de medida cuando incubamos *Escherichia coli* con cloranfenicol y aMT (200 mcM) en EDDA-MH; este quelante además de ser un quelante del hierro es un buen neutralizador de los cationes divalentes libres en el medio de cultivo (la mayoría de los radicales libres prooxidantes lo son); podemos deducir por tanto, que los radicales libres en el medio de cultivo actúan de diferente forma sobre la adherencia a filtros de nitrocelulosa o sobre la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*.

Como ya ha sido comentado con anterioridad el primer paso en la colonización de un epitelio por *Escherichia coli* está determinado por la propiedad de la bacteria de adherirse a las células del huésped, esta facultad está determinada inicialmente por la carga eléctrica de superficie del microorganismo y su hidrofobicidad de superficie (70); y posteriormente por otros factores como la formación de pilli y adhesinas específicas que en el caso de *Escherichia coli* se relacionan de forma importante con su patogenicidad (166-168).

Diversos estudios (188-190), han demostrado que la administración de altas dosis de vitamina E en animales se asocia con niveles más altos de anticuerpos frente a *Escherichia coli*, desconocemos si esta observación tiene relación con las disminuciones de hidrofobicidad de superficie observadas en nuestro estudio; aunque a nivel teórico la disminución de la hidrofobicidad de superficie por *Escherichia coli* originaría una mayor dificultad para la colonización de epitelios, tanto gastrointestinal como genitourinario. Por otro lado, el efecto adyuvante descrito de la vitamina E (190) en la inducción de respuesta inmune humoral podría deberse a la disminución de la peroxidación de la superficie bacteriana, en consecuencia mayor expresión de los determinantes antigénicos bacterianos. Podemos pues presuponer un punto de equilibrio entre efectos beneficiosos para el huésped de los antioxidantes (en concreto de la vitamina E) y efectos perjudiciales; ya que la disminución de la hidrofobicidad de superficie que haría al germen menos susceptible a la fagocitosis, lo hace en cambio más inmunógeno y por tanto más fácilmente marcable y eliminable por los sistemas de inmunidad específicos.

El cloranfenicol a dosis subletales (100 µg/ml) inhibe la síntesis proteica de los microorganismos (156), en nuestro estudio hemos utilizado la incubación con cloranfenicol y melatonina (200 mcM) con la finalidad de comprobar si las modificaciones observadas en las características de superficie de *Escherichia coli* se deben a síntesis proteica *de novo*. Comprobamos que la melatonina induce disminuciones de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* que se mantienen invariables al incubar con cloranfenicol + melatonina (200 mcM); por tanto, podemos inferir que el efecto de la melatonina sobre la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* no se debe a síntesis *de novo* de proteínas de superficie del microorganismo. La adherencia de *Escherichia coli* a la nitrocelulosa (en presencia de hierro) incubada con melatonina (200 mcM) + cloranfenicol aumenta significativamente hasta porcentajes próximos a los observados con vitamina E. Posiblemente la inhibición

de la síntesis proteica mediada por el cloranfenicol determina una mayor expresión del efecto de la melatonina a altas concentraciones sobre las propiedades de superficie de *Escherichia coli* que se asemeja al observado al incubar *Escherichia coli* con vitamina E.

Aunque la incubación de *Escherichia coli* con melatonina o sin ella no permite observar diferencias significativas en la hidrofobicidad de superficie, en ambos casos, la tendencia observada es hacia una disminución de la misma en presencia de melatonina; esta disminución es más acusada cuando incubamos *Escherichia coli* con otro antioxidante como la vitamina E. Llama la atención que *Escherichia coli* responda de distinta forma a la melatonina o a la vitamina E suplementada al medio de cultivo. Diversos estudios (145;150), han demostrado que la melatonina se comporta en la mayoría de las situaciones como un potente antioxidante, si cabe más potente que la vitamina E; pensamos por ello, que la variabilidad de los efectos descritos entre ambos antioxidantes y la aproximación de los efectos observados en la adherencia a la nitrocelulosa al incubar con aMT + cloranfenicol o vitamina E, podrían estar en relación con la síntesis proteica *de novo* del microorganismo. De hecho, no faltan estudios que demuestran un incremento de la síntesis de determinados productos celulares tras estímulo con melatonina (191;192). Estas observaciones hasta cierto punto válidas para células eucariotas no han sido comprobadas en la célula bacteriana; sin embargo, no parece improbable que los efectos metabólicos de la melatonina descritos en células eucariotas puedan ser equiparables en la célula bacteriana. En esta línea argumental la inhibición de la síntesis proteica con cloranfenicol dotaría a la melatonina de un efecto antioxidante hasta cierto punto similar al descrito para la vitamina E.

Otro hecho a tener en cuenta a la hora de valorar nuestros resultados deriva de la revisión del origen de las cepas de *Escherichia coli* estudiadas, ya que en su mayoría son de origen genitourinario, recordemos que la melatonina y sus metabolitos se eliminan por la orina; por lo que *Escherichia coli* uropatógeno debe haberse adaptado a la presencia periódica de la hormona en orina. Recordemos que una disminución de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* inducida por melatonina endógena (normalmente eliminada por orina), supondría una más fácil eliminación de los epitelios urinarios colonizados por *Escherichia coli*; por tanto un microorganismo uropatógeno debe haber desarrollado mecanismos adaptativos para anular el efecto de la melatonina, que sí hemos observado en otros microorganismos gramnegativos no uropatógenos y que seguidamente comentaremos.

9.3. Consideraciones sobre la medida de hidrofobicidad de superficie y adherencia a filtros de nitrocelulosa en *Neisseria meningitidis*.

Como ya ha sido comentado, la hidrofobicidad de superficie de las bacterias es la mayor o menor afinidad de las bacterias para mantenerse en suspensión en un sustrato acuoso; esta característica ha sido implicada en la colonización de los epitelios de mamíferos (76;158;193), y en su mayor o menor tendencia a la fagocitosis (185;194). Sin embargo, pese a su teórica importancia en la virulencia de *Neisseria meningitidis* no

ha sido posible encontrar hasta el presente un paralelismo claro entre esta característica de superficie y las manifestaciones clínicas del microorganismo, que puede tanto permanecer en la orofaringe de portadores asintomáticos o manifestarse como una enfermedad grave con diseminación sistémica y sepsis fatal (176). Por tanto, es obligado deducir que otros factores inherentes al huésped y no sólo al microorganismo, pueden estar implicados en el diferente comportamiento de *Neisseria meningitidis*, en unos individuos u otros.

Durante los últimos años se ha producido un importante avance en el conocimiento del papel inmunomodulador de la melatonina (155;195), así como su participación en los procesos de estabilización del estrés oxidativo mediante la neutralización de radicales libres (132;133) y estabilización de membrana (196). La melatonina es una hormona de la glándula pineal que tiene una función estabilizadora y reguladora general del organismo (197). En el ser humano se ha aceptado su papel en la regulación del sueño, así mismo se ha implicado en la respuesta inmune (198).

Las Tablas 8.7 a 8.12 muestran los valores medios de hidrofobicidad de superficie obtenidos en *Neisseria meningitidis* al incubar con melatonina a concentraciones crecientes desde 0 nM a 200 mcM. en medio de cultivo Müller-Hinton (MH), con citrato amónico ferroso (FAC-MH) y con un quelante de cationes divalentes y de hierro (EDDA-MH). Como puede comprobarse tras realizar los estudios de comparación que se describen en el capítulo de resultados, la concentración de hierro en el medio de cultivo no modifica significativamente la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis*, tan solo, cuando incubamos con melatonina a concentraciones 10 µM observamos diferencias entre la hidrofobicidad de *Neisseria meningitidis* en MH y FAC-MH, y a concentraciones de melatonina de 200 mcM entre *Neisseria meningitidis* en MH y EDDA-MH. *Neisseria meningitidis* incubado con melatonina a concentraciones inferiores a 200 mcM., tras 12 horas de crecimiento (fase de crecimiento logarítmico medio) no modifica su hidrofobicidad de superficie; sin embargo cuando incubamos con melatonina a concentraciones 200 mcM observamos un incremento significativo de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis*, independiente de la concentración de hierro del medio de cultivo. Considerada globalmente, la tendencia es hacia un aumento de la hidrofobicidad de superficie a concentraciones de melatonina más altas, si bien el estudio de regresión lineal (Tabla 8.35) no permite aseverar en firme este punto; determinadas cepas de *Neisseria meningitidis* como P000 no modifica su hidrofobicidad de superficie en ninguno de los medios de cultivo ni a las concentraciones de melatonina consideradas; V019 muestra idéntico comportamiento en FAC-MH; el reducido número de cepas incluido en nuestro estudio y las variabilidad de los resultados obtenidos entre cepas pensamos puede estar en la raíz de la inexistencia de regresión estadísticamente significativa entre melatonina e hidrofobicidad de superficie. El incremento de la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* en presencia de FAC es un 10% mayor que la observada tras incubación en un medio con quelante del hierro; si consideramos el ión Fe^{+2} además de cómo un elemento nutritivo para la bacteria, como un elemento iniciador de las reacciones de peroxidación (97), y la hidrofobicidad de superficie como una característica íntimamente relacionada con la peroxidación de los componentes proteicos, lipoproteicos y glucoproteicos de superficie (186), podemos explicar el

mayor porcentaje de hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis*, cuando es incubada con hierro suplementario. Llama la atención el hecho de que el incremento de hidrofobicidad de superficie en *Neisseria meningitidis* incubada con aMT a altas concentraciones se vea revertido, incluso hasta porcentajes por debajo de los observados tras incubación sin aMT, al añadir cloranfenicol a dosis subletales al medio de cultivo. El efecto de la inhibición de la síntesis proteica en *Neisseria meningitidis* sobre la hidrofobicidad de superficie es espectacular; de hecho, observamos disminuciones de éste parámetro de hasta un 64.7% en medio con EDDA suplementado con aMT a altas concentraciones, cuando preincubamos con cloranfenicol. Globalmente y comparando estos resultados con los obtenidos en *Escherichia coli* podemos afirmar que el efecto de la aMT a dosis de 200 mcM es tangencialmente distinto en ambos gémenes y que la contribución de la síntesis proteica *de novo* a la variabilidad de la hidrofobicidad de superficie inducida por aMT es igualmente distinta en ambas bacterias; intervienen sin duda respuestas metabólicas y adaptativas diferentes en cada género bacteriano.

Sin embargo, la adherencia de *Neisseria meningitidis* a filtros de nitrocelulosa que se incrementa ligeramente tras incubación con aMT a concentraciones 200 mcM., sí muestra coeficientes de regresión significativos (Tabla 8.36) con la concentración de aMT. Aunque el comportamiento de las cepas de *Neisseria meningitidis* estudiadas es bastante uniforme en lo referente a adherencia a la nitrocelulosa, la cepa P391 de *Neisseria meningitidis* muestra un descenso de la adherencia a filtros de hasta un 40% cuando incubamos con melatonina a concentraciones nM.

La hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* incubada sin melatonina en medio FAC-MH y EDDA-MH se correlaciona significativamente (r_0 Spearman) con la hidrofobicidad de superficie observada tras incubación con concentraciones crecientes de melatonina. Sin embargo, cuando el medio de cultivo tiene un contenido normal de hierro (MH) no observamos correlaciones significativas en la hidrofobicidad de superficie obtenida tras incubación con melatonina a esas mismas concentraciones. La adherencia a filtros de nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* en FAC-MH incubada sin melatonina no se correlaciona significativamente con la observada tras incubación con melatonina a concentraciones 1 nMol a 200 mcM; en situaciones de concentraciones normal de hierro (MH) o con restricción de hierro (EDDA-MH) las correlaciones son muy variables.

Si la adhesión a células es fundamental para la colonización de un tejido, el crecimiento bacteriano y la expresión de antígenos de superficie, también son un elemento clave en el reconocimiento y fagocitosis por parte del sistema mononuclear-fagocítico, que vendrían a evitar la posterior diseminación del microorganismo y su capacidad para inducir enfermedad. Los ensayos realizados hasta el presente (199), son concluyentes en el hecho de que varios factores ajenos al propio microorganismo deben incidir en el desarrollo de enfermedad meningocócica invasiva, ya que la necesaria adherencia del germen al epitelio faríngeo mediada por sus adhesinas, se convierte en un elemento que vendría a impedir su posterior diseminación, al ser estas adhesinas fácilmente reconocidas por los fagocitos circulantes del huésped. Por otro lado, la observación de que la presencia o ausencia de hierro en el medio de cultivo puede ser un factor clave en la mayor o menor expresión de proteínas de superficie con afinidad por la transferrina (200), el estímulo en la síntesis de catalasa y superóxido dimutasa

cuando la bacteria es preincubada en presencia de concentraciones subinhibitorias de O_2^- y H_2O_2 , indican que los cambios en las características de superficie de la bacteria son respuestas concretas a modificaciones puntuales en el entorno del microorganismo; y que determinadas características de superficie como la hidrofobicidad o la diferente expresión de determinados antígenos de superficie de la bacteria, lejos de ser una característica estática son elementos cambiantes con la modificación del entorno. A este respecto la peroxidación y la respuesta de la bacteria a los mecanismos oxidativos del huésped, desarrollados en el sentido de fomentar su eliminación, deben ser los elementos clave en los cambios patogénicos observados en *Neisseria meningitidis* durante la fase de portador asintomático o microorganismo invasivo.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la melatonina en la activación de los procesos inmunes del organismo (201;202), relacionándose con el rechazo de células tumorales (154), liberación de linfocinas (203), disminución en la secreción de interferón gamma y factor de necrosis tumoral (203) y últimamente como agente mejorador del pronóstico en el tratamiento del shock endotóxico (202;204). Los mecanismos a partir de los cuales la melatonina es capaz de modular el sistema inmune no son conocidos con precisión, pero basados en experiencias muy diversas han sido sugeridos los siguientes: a) *Mediante la relación entre glándula pineal, sistema inmune y sistema opioide endógeno*, se ha comunicado que determinados péptidos opioides pueden ser mediadores de la acción de la melatonina sobre el sistema inmune (205), b) *Las linfocinas como mediadores de la acción de la melatonina sobre el sistema inmune*, la demostración de que tanto la producción de interleukina-2, como (-interferón son estimulados en su producción por melatonina (205), así como el conocimiento de que ambos productos a su vez actúan estimulando la actividad de los NK y otros elementos del sistema inmune (192), han hecho que se especule sobre la posibilidad de que estas linfocinas sean mediadoras de los efectos observados con la melatonina sobre la respuesta inmune, c) *Acciones indirectas de la melatonina a través de otros sistemas endocrinos*, se ha sugerido que el eje hipotálamo-hipofiso-gonadal puede estar relacionado con la acción que la melatonina tiene sobre el sistema inmune en base a experiencias que demuestran que tanto el fotoperiodo como el tratamiento con melatonina afectan conjuntamente la capacidad reproductora, producción de hormonas sexuales y determinadas funciones inmunes (192). Además es bien conocido como la melatonina es capaz de antagonizar el efecto supresor de los corticosteroides sobre el sistema inmune (206), d) *Acción directa de la melatonina sobre el tejido linfoide*, diferentes trabajos han demostrado que con 2^{125} -Iodo-melatonina se demuestran "binding sites" en homogenados de órganos linfoides (207), e) *Acción neutralizadora de radicales libres* (133). Hasta aquí, lo deducido sobre las acciones de la melatonina en el huésped, quedan por dilucidar los efectos sobre las células bacterianas en general y sobre *Neisseria meningitidis* en particular.

Diversos estudios (208), han constatado una disminución de la quimiotaxis y liberación de radicales libres en los fagocitos tras exposición a dosis 100 μ M de melatonina, en tanto con dosis menores no se obtienen efectos aparentes. Estos resultados podrían ser extrapolables a los nuestros, ya que las modificaciones en la hidrofobicidad de superficie observada, sólo son aparentes cuando incubamos el microorganismo con concentraciones 200 μ M de melatonina, niveles muy superiores a

los observados en situaciones fisiológicas en el organismo; pero que podrían obtenerse fácilmente tras la administración farmacológica propuesta por diversos autores (154). Estos incrementos en la hidrofobicidad de superficie observados en *Neisseria meningitidis*, parecen ser independientes de la suplementación o restricción de hierro en el medio de cultivo. A la vista de estos hallazgos, habría que hablar de un punto de equilibrio entre la disminución de la quimiotaxis y liberación de radicales libres inducida por la aMT en las células del sistema mononuclearfagocítico y por otro lado del incremento de la hidrofobicidad de superficie de la bacteria muy probablemente resultado del aumento de expresión de proteínas de superficie de la bacteria inducida por aMT. En esta línea argumental y considerando diversos estudios donde se refiere la restricción de hierro como un elemento ligado a la mayor expresión de proteínas ligadas a la transferrina 1 y 2 (TBP1 y TBP2) (209;210), podría deducirse de las observaciones Minotti G. y cols. (97) que la menor expresión de estas proteínas en presencia de hierro pudiera deberse a una mayor peroxidación inducida por el ión ferroso. Por tanto la variabilidad en las características de superficie de *Neisseria meningitidis*, y su diferente perfil adaptativo a las cambiantes condiciones del medio lo harían en ocasiones altamente hidrofóbico, muy adherente a superficies celulares, y por tanto fácilmente eliminable por el huésped; en otras ocasiones lo harían poco hidrofóbico, poco adherente a superficies celulares, pero muy antigénico. Sin duda el punto de imbalance entre estas características, así como el estado inmunitario del huésped determinarían el resultado final de la infección.

Aunque el exceso de hierro sí parece determinar un ligero incremento en la hidrofobicidad de superficie tras incubación con dosis μM y mM de melatonina. De forma similar y tras incubación de *Neisseria meningitidis* con melatonina a concentraciones 200 μM se observa un incremento importante en la adhesión a filtros de nitrocelulosa. En presencia de hierro y ausencia de aMT, la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis* se relaciona intensamente con la obtenida tras incubación con concentraciones crecientes de aMT. Estas consideraciones no son válidas cuando el medio de cultivo posee concentraciones normales de hierro o éste está restringido. Sin duda, la existencia de hierro en el medio de cultivo más la presencia de un antioxidante y eliminador de radicales libres (scavenger), como es la melatonina, tienen un efecto sinérgico sobre determinados componentes de superficie de *Neisseria meningitidis* que se manifiestan con un incremento de hidrofobicidad de superficie. Este efecto sinérgico bien podría ser por un lado el estímulo de la síntesis *de novo* en las proteínas de superficie de *Neisseria meningitidis* inducido por melatonina y por otro lado la iniciación de la peroxidación de la superficie bacteriana por el ión ferroso (97).

CONCLUSIONES

10. Conclusiones

1°. A la luz de los resultados obtenidos en el presente proyecto de Tesis Doctoral y considerando que existe una relación entre las propiedades de superficie de las bacterias y su capacidad de adherencia a epitelios, podemos afirmar que:

- A) La hidrofobicidad de superficie y la adherencia a la nitrocelulosa son propiedades inherentes y variables en cada microorganismo, que sufren modificaciones con la variabilidad del medio donde se desarrolla el microorganismo.
- B) La diferente concentración de hierro del medio de cultivo no es un factor decisivo a la hora de explicar la variabilidad observada en la hidrofobicidad de superficie y adherencia a la nitrocelulosa de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.

2°. En relación al efecto de la melatonina sobre la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*, son pertinentes las siguientes consideraciones:

- A) Independientemente del contenido en hierro del medio de cultivo la melatonina a concentraciones nM no modifica significativamente la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli*.
- B) A concentraciones μM , la melatonina induce una disminución relevante de la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* incubada en presencia de concentraciones estándar de hierro, modificaciones que no se relacionan con la síntesis proteica *–de novo*” por la bacteria.

3°. El efecto de la melatonina sobre la adherencia a los filtros de nitrocelulosa en *Escherichia coli* puede expresarse en los siguientes términos:

- A) A concentraciones nM, la melatonina ejerce un efecto irrelevante sobre la adherencia a la nitrocelulosa.
- B) A concentraciones μM , la melatonina induce leves disminuciones del porcentaje de adherencia a la nitrocelulosa, que se podrá revertir al inhibir la síntesis proteica *“de novo”* con cloranfenicol.

4°. En la misma línea que las conclusiones anteriores, y en referencia a la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis*, podemos afirmar:

A) A concentraciones nM, la melatonina no modifica la hidrofobicidad de superficie.

B) A concentraciones μM , la melatonina induce incrementos de relevancia en la hidrofobicidad de superficie.

C) La inhibición de la síntesis proteica con cloranfenicol origina disminuciones sustanciales de la hidrofobicidad de superficie del microorganismo, lo que viene a indicar que la síntesis proteica “*de novo*” es un determinante importante en la hidrofobicidad de superficie de *Neisseria meningitidis*.

5°. El efecto de la melatonina sobre la adherencia a la nitrocelulosa de *Neisseria meningitidis* puede expresarse en los siguientes puntos:

A) A concentraciones nM, la melatonina ejerce un efecto irrelevante sobre la adherencia a la nitrocelulosa.

B) A concentraciones μM , la melatonina induce ligeros aumentos del porcentaje de adherencia a la nitrocelulosa cuando el microorganismo se incubaba en presencia de hierro suplementario, estas modificaciones no revierten al inhibir la síntesis proteica “*de novo*” con cloranfenicol.

6°. La vitamina E ejerce un efecto sobre las propiedades de superficie estudiadas en *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* que se pueden resumir en los siguientes puntos:

A) Disminución estadísticamente relevante de la hidrofobicidad de superficie, tanto en *Escherichia coli* como en *Neisseria meningitidis*.

B) Aumento del porcentaje de adherencia a la nitrocelulosa tanto en *Escherichia coli* como en *Neisseria meningitidis*.

7°. Por último, y según se desprende de las conclusiones anteriores, evidenciamos:

A) Efectos contrapuestos de la melatonina a concentraciones μM sobre la hidrofobicidad de superficie de *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.

B) Modificaciones de mayor relevancia de las propiedades de superficie estudiadas en el presente proyecto de Tesis Doctoral para *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis* tras incubación con vitamina E.

C) La contribución de la síntesis proteica *de novo* a la variabilidad de la hidrofobicidad de superficie inducida por melatonina es sustancialmente distinta en *Escherichia coli* y *Neisseria meningitidis*.

Apreciaciones que nos hacen suponer un efecto relevante de los antioxidantes estudiados, y en general de los procesos de oxidoreducción sobre las características de superficie de *Escherichia coli* y *Neisseria meningítidis*, y probablemente sobre su potencial patogenicidad.

BIBLIOGRAFÍA

11. Bibliografía

- (1) Liébana J. Microbiología oral. Mc Graw-Hill-Interamericana, 1997: 11-29.
- (2) Gracia Rodríguez JA, Picazo JJ. Microbiología médica general. Mosby/Doyma Libros, S.A., 1996: 41-51.
- (3) Pujol C, Eugene E, Marceau M, Nassif X. The meningococcal PilT protein is required for induction of intimate attachment to epithelial cells following pilus-mediated adhesion. Proc Natl Acad Sci U S A 1999; 96(7):4017-4022.
- (4) Gibbons RJ, Houte JV. Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu Rev Microbiol 1975; 29:19-44.
- (5) Horska E, Pokorny J, Labajova M. Effect of cultivation medium on some physicochemical parameters of outer bacterial membrane. Microbios 1995; 81:203-211.
- (6) Gibbons RJ, Qureshi JV. Virulence-related physiological changes and antigenic variation in populations of Streptococcus mutans colonizing gnotobiotic rats. Infect Immun 1980; 29(3):1082-1091.
- (7) 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; 20(Mar):127-139.
- (8) 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; 37(3):497-503.
- (9) 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; 8(3):405-411.
- (10) 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; 19(2):727-736.
- (11) 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; 11(4):471-492.
- (12) Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, Falkow S. Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* 1981; 294(5842):665-667.
- (13) McIntyre J, Rowley D, Jenkin CR. The functional heterogeneity of macrophages at the single cell level. *Aust J Exp Biol Med Sci* 1967; 45(6):675-680.
- (14) Brunson JG, Gall EA. *Tratado de patología humana*. 1 ed. Mexico: Interamericana, 1975.
- (15) 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; 292(5822):457-459.
- (16) Heinzelmann M, Herzig DO, Swain B, Mercer-Jones MA, Bergamini TM, Polk HCJ. Phagocytosis and oxidative-burst response of planktonic *Staphylococcus epidermidis* RP62A and its non-slime-producing variant in human neutrophils. *Clin Diagn Lab Immunol* 1997; 4(Nov.):705-710.
- (17) Pruijboom IM, Rimler RB, Ackermann MR. Enhanced adhesion of *Pasteurella multocida* to cultured turkey peripheral blood monocytes. *Infect Immun* 1999; 67(3):1292-1296.
- (18) McCarthy RA, Hay ED. Collagen I, laminin, and tenascin: ultrastructure and correlation with avian neural crest formation. *Int J Dev Biol* 1991; 35(4):437-452.
- (19) Naito Y, Tohda H, Okuda K, Takazoe I. Adherence and hydrophobicity of invasive and noninvasive strains of *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8(Aug.):195-202.
- (20) Zabel LT, Neuer A, Manncke B. Fibronectin binding and cell surface hydrophobicity contribute to adherence properties of group B streptococci. *Zentralbl Bakteriologie* 1996; 285(Sep.):35-43.
- (21) 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.
- (22) 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; 47(8):705-709.
-

-
- (23) Gutierrez-Fernández J. La adherencia bacteriana como factor de virulencia en la sepsis. *Anales de Medicina Interna* 1989; 6(9):489-496.
 - (24) Fowler JE, Jr., Latta R, Stamey TA. Studies of introital colonization in women with recurrent urinary infections. VIII. The role of bacterial interference. *J Urol* 1977; 118(2):296-298.
 - (25) Svanborg-Eden C, Sandberg T, Stenqvist K, Ahlstedt S. Effects of subinhibitory amounts of ampicillin, amoxycillin and mecillinam on the adhesion of *Escherichia coli* bacteria to human urinary tract epithelial cells: a preliminary study. *Infection* 1979; 7 Suppl 5:S452-S455.
 - (26) Svanborg-Eden C. [Antibodies in the secretion can modify the adhesiveness of bacteria on mucous membrane areas]. *Lakartidningen* 1979; 76(40):3400-3401.
 - (27) Mayrand D, Holt SC. Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol Rev* 1988; 52(1):134-152.
 - (28) Silverblatt FJ, Ofek I. Influence of pili on the virulence of *Proteus mirabilis* in experimental hematogenous pyelonephritis. *J Infect Dis* 1978; 138(5):664-667.
 - (29) Whitnack E, Bisno AL, Beachey EH. Hyaluronate capsule prevents attachment of group A streptococci to mouse peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1981; 31(3):985-991.
 - (30) Selinger DS, Reed WP. Pneumococcal adherence to human epithelial cells. *Infect Immun* 1979; 23(2):455-458.
 - (31) Bartelt MA, Duncan JL. Adherence of group A streptococci to human epithelial cells. *Infect Immun* 1978; 20(1):200-208.
 - (32) Craven DE, Frasch CE, Robbins JB. Meningococcal vaccines and disease due to other serogroups [letter]. *Lancet* 1978; 2(8096):939-940.
 - (33) Adlerberth I, Svanborg C, Carlsson B, Mellander L, Hanson LA, Jalil F et al. P fimbriae and other adhesins enhance intestinal persistence of *Escherichia coli* in early infancy. *Epidemiol Infect* 1998; 121(3):599-608.
 - (34) Bose B. *Pseudomonas* immunoglobulin and vaccine in burn patients [letter]. *Lancet* 1981; 1(8217):435.
 - (35) Cohen C, Phillips GN, Jr. Spikes and fimbriae: alpha-helical proteins form surface projections on microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78(9):5303-5304.

-
- (36) Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 1981; 35:299-324.
- (37) Marrie TJ, Lam J, Costerton JW. Bacterial adhesion to uroepithelial cells: a morphologic study. *J Infect Dis* 1980; 142(2):239-246.
- (38) 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; 143(2):219-230.
- (39) Peterson PK, Quie PG. Bacterial surface components and the pathogenesis of infectious diseases. *Annu Rev Med* 1981; 32:29-43.
- (40) Beachey EH. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surface. *J Infect Dis* 1981; 143(3):325-345.
- (41) 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; 91(9):3769-3773.
- (42) 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; 18(Nov.):741-754.
- (43) 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; 117(3):391-398.
- (44) Fox EN. M proteins of group A streptococci. *Bacteriol Rev* 1974; 38(1):57-86.
- (45) McGee ZA, Gross J, Dourmashkin RR, Taylor-Robinson D. Nonpilar surface appendages of colony type 1 and colony type 4 gonococci. *Infect Immun* 1976; 14(1):266-270.
- (46) 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; 23(Mar.):879-892.
- (47) Mett H, Kloetzlen L, Vosbeck K. Properties of pili from *Escherichia coli* SS142 that mediate mannose- resistant adhesion to mammalian cells. *J Bacteriol* 1983; 153(2):1038-1044.
-

-
- (48) 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; 32(2):796-804.
- (49) Firon N, Ofek I, Sharon N. Interaction of mannose-containing oligosaccharides with the fimbrial lectin of *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 1982; 105(4):1426-1432.
- (50) 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; 67(2):834-843.
- (51) Maas WK. Genetics of bacterial virulence. In: Glower SW, Hopwood DA, editors. *Genetics as a tool in Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press, 1981: 341-360.
- (52) Freter RR, Savageau MA. Proofreading systems of multiple stages for improved accuracy of biological discrimination. *J theor Biol* 1980; 85(1):99-123.
- (53) 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; 178(1-2):169-179.
- (54) Schragger 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; 101(8):1708-1716.
- (55) 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; 32(2):484-489.
- (56) Banai M, Razin S, Bredt W, Kahane I. Isolation of binding sites to glycophorin from *Mycoplasma pneumoniae* membranes. *Infect Immun* 1980; 30(3):628-634.
- (57) Svanborg EC, Bjursten LM, Hull R, Hull S, Magnusson KE, Moldovano Z et al. Influence of adhesins on the interaction of *Escherichia coli* with human phagocytes. *Infect Immun* 1984; 44(3):672-680.
- (58) McNeish AS, Turner P, Fleming J, Evans N. Mucosal adherence of human enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* 1975; 2(7942):946-948.
- (59) Smith HW, Parsell Z. Transmissible substrate-utilizing ability in enterobacteria. *J Gen Microbiol* 1975; 87(1):129-140.
-

-
- (60) Smith HW, Parsell Z, Green P. Thermosensitive antibiotic resistance plasmids in enterobacteria. *J Gen Microbiol* 1978; 109(1):37-47.
 - (61) 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; 6(3):849-865.
 - (62) Formal SB, Hornick RB. Invasive *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 1978; 137(5):641-644.
 - (63) Pumarola Busquets A, Piédrola Gil G. *Medicina preventiva y social. Higiene y Sanidad ambiental*. 7 ed. Madrid: Amaro, 1983.
 - (64) 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; 14:828-837.
 - (65) 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; 13(3):219-224.
 - (66) Verheul AF, Snippe H, Poolman JT. Meningococcal lipopolysaccharides: virulence factor and potential vaccine component. *Microbiol Rev* 1993; 57(1):34-49.
 - (67) 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; 19(6):391-407.
 - (68) Werner RG, Daneck KH. Possible mechanism of fusidic acid resistance in *E. coli*. *Arzneimittelforschung* 1981; 31(5):757-761.
 - (69) Beachey EH, Eisenstein BI, Ofek I. Sublethal concentrations of antibiotics and bacterial adhesion. *Ciba Found Symp* 1981; 80:288-305.
 - (70) Ferreirós CM, Criado MT. Expression of surface hydrophobicity encoded by R-plasmids in *Escherichia coli* laboratory strains. *Arch Microbiol* 1984; 138:191-194.
 - (71) 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; 63(6):1219-1228.
-

-
- (72) 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; 68(5):1381-1384.
- (73) 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.
- (74) Smyth CJ, Siegel J, Salton MR, Owen P. Immunochemical analysis of inner and outer membranes of *Escherichia coli* by crossed immunoelectrophoresis. *J Bacteriol* 1978; 133(1):306-319.
- (75) 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 24:93-99.
- (76) 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; 85B(5):334-340.
- (77) 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; 145(3):220-227.
- (78) 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; 143(3):1127-1134.
- (79) 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; 114(2):305-312.
- (80) Ellen RP, Gibbons RJ. M protein-associated adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial surfaces: prerequisite for virulence. *Infect Immun* 1972; 5(5):826-830.
- (81) Hermansson M, Kjellberg S, Norkrans B. Interaction of pigmented wildtype and pigmentless mutant of *Serratia marcescens* with lipid surface film. *FEMS Microbiol Letters* 1979; 6:129-132.
- (82) Parton R. Envelope proteins in *Salmonella minnesota* mutants. *J Gen Microbiol* 1975; 89(1):113-123.
-

-
- (83) 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; 7(4):1450-1460.
- (84) Davis BD. *Tratado de microbiología*. 4ª ed. Barcelona: Masson, 1997.
- (85) García Rodríguez JA, Picazo JJ. *Microbiología médica*. Barcelona: Mosby/Doyma, 1996.
- (86) Pumarola A. *Microbiología y parasitología médica*. Barcelona: Masson, 1997.
- (87) Halliwell B, Gutteridge JM. Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett* 1992; 307(1):108-112.
- (88) Sies H. Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin Wochenschr* 1991; 69(21-23):965-968.
- (89) Murrell GA, Francis MJ, Bromley L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem J* 1990; 265(3):659-665.
- (90) Fridovich I. Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radic Biol Med* 1989; 7(5):557-558.
- (91) Fridovich I. Superoxide dismutases: studies of structure and mechanism. *Adv Exp Med Biol* 1976; 74:530-539.
- (92) Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull* 1993; 49(3):481-493.
- (93) McCord JM. Free radicals and heart disease. *Bibl Nutr Dieta* 1989;(43):327-337.
- (94) Chance B, Villringer A, Dirnagl V, Einhaupl KM. Optical imaging of brain function and metabolism. Garmisch- Partenkirchen, 21-22 October 1991 [news]. *J Neurol* 1992; 239(7):359-360.
- (95) Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134(3):707-716.
- (96) 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; 710(2):197-211.
-

-
- (97) Minotti G, Aust SD. The role of iron in the initiation of lipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 1987; 44(2-4):191-208.
- (98) Sevanian A, Hochstein P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* 1985; 5:365-390.
- (99) Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 1993; 57(5 Suppl):715S-724S.
- (100) Kanofsky JR, Sima P. Singlet oxygen production from the reactions of ozone with biological molecules. *J Biol Chem* 1991; 266(14):9039-9042.
- (101) Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett* 1975; 54(3):311-314.
- (102) Aw TY, Ookhtens M, Kaplowitz N. Mechanism of inhibition of glutathione efflux by methionine from isolated rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1986; 251(3 Pt 1):G354-G361.
- (103) Bracci R. Calcium involvement in free radical effects [editorial]. *Calcif Tissue Int* 1992; 51(6):401-405.
- (104) Orrenius S, McConkey DJ, Bellomo G, Nicotera P. Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol Sci* 1989; 10(7):281-285.
- (105) Kukreja RC, Kontos HA, Hess ML, Ellis EF. PGH synthase and lipoxygenase generate superoxide in the presence of NADH or NADPH. *Circ Res* 1986; 59(6):612-619.
- (106) 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):325-331.
- (107) Flitter WD. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull* 1993; 49(3):545-555.
- (108) Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 73(3):599-601.
- (109) Winrow VR, Winyard PG, Morris CJ, Blake DR. Free radicals in inflammation: second messengers and mediators of tissue destruction. *Br Med Bull* 1993; 49(3):506-522.
- (110) Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21(4):361-374.
-

-
- (111) 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; 262(3):1098-1104.
- (112) Poli G. Liver damage due to free radicals. *Br Med Bull* 1993; 49(3):604-620.
- (113) Thornalley PJ, Wolff SP, Crabbe MJ, Stern A. The oxidation of oxyhaemoglobin by glyceraldehyde and other simple monosaccharides. *Biochem J* 1984; 217(3):615-622.
- (114) Jiang ZY, Woollard AC, Wolff SP. Hydrogen peroxide production during experimental protein glycation. *FEBS Lett* 1990; 268(1):69-71.
- (115) Roche E, Romero-Alvira D. [Changes in DNA induced by oxidative stress]. *Med Clin (Barc)* 1996; 106(4):144-153.
- (116) Gillery P, Monboisse JC, Maquart FX, Borel JP. [Aging mechanisms of proteins]. *Diabete Metab* 1991; 17(1):1-16.
- (117) Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences [published erratum appears in *Free Radic Biol Med* 1991;10(3-4):249]. *Free Radic Biol Med* 1990; 9(4):315-325.
- (118) Bindoli A. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic Biol Med* 1988; 5(4):247-261.
- (119) Curtis MT, Gilfor D, Farber JL. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Arch Biochem Biophys* 1984; 235(2):644-649.
- (120) Cheeseman KH. Mechanisms and effects of lipid peroxidation. *Mol Aspects Med* 1993; 14(3):191-197.
- (121) Dobretsov GE. [Fluorescent probe study of the spatial structure of membranes and lipoproteins]. *Ukr Biokhim Zh* 1984; 56(2):211-222.
- (122) Richter C. Biophysical consequences of lipid peroxidation in membranes. *Chem Phys Lipids* 1987; 44(2-4):175-189.
- (123) 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; 235(2):179-188.
- (124) Schroeder F. Role of membrane lipid asymmetry in aging. *Neurobiol Aging* 1984; 5(4):323-333.
- (125) Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 1984; 105:121-126.
-

-
- (126) Archibald FS, Duong MN. Superoxide dismutase and oxygen toxicity defenses in the genus *Neisseria*. *Infect Immun* 1986; 51(2):631-641.
- (127) Monte M, Davel LE, de Lustig ES. Inhibition of lymphocyte-induced angiogenesis by free radical scavengers. *Free Radic Biol Med* 1994; 17(3):259-266.
- (128) Mannervik B. The isoenzymes of glutathione transferase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 1985; 57:357-417.
- (129) Beutler E. Nutritional and metabolic aspects of glutathione. *Annu Rev Nutr* 1989; 9:287-302.
- (130) Burton GW, Joyce A, Ingold KU. First proof that vitamin E is major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma [letter]. *Lancet* 1982; 2(8293):327.
- (131) Reiter RJ, Tan DX, Poeggeler B, Menendezpelaez A, Chen LD, Saarela S. Melatonin as a Free Radical Scavenger Implications for Aging and Age Related Diseases. *Ann NY Acad Sci* 1994; 719:1-12.
- (132) Hardeland R, Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: Antioxidative protection and formation of bioactive substances. *Neurosci Biobehav Rev* 1993; 17:347-357.
- (133) Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Poeggeler B, Barlowwalden L, Chuang JI et al. A Review of the Evidence Supporting Melatonins Role as an Antioxidant. *J Pineal Res* 1995; 18:1-11.
- (134) Kennaway DJ. Factors influencing the development of melatonin rhythmicity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1525-1532.
- (135) Amt-Rhythm in preterm newborns. 90 Sep 11; Lyon (Francia): European Society of Perinatal Medicine, 1990.
- (136) Pierpaoli W, Changxian Y. The involvement of pineal gland and melatonin in immunity and aging. I. Thymus-mediated, immunoreconstituting and antiviral activity of thyrotropin-releasing hormone. *Journal of Neuroimmunology* 1990; 27:99-109.
- (137) Affective deprivation syndrome and the indoleamide theory of depression: Possible correlation. 95 Apr 2; Helsinki (Finland): European Journal of Clinical Investigation., 1994.
- (138) Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin suppression of tumor growth in vivo: A novel mechanism involving inhibition of fatty acid uptake and
-

-
- metabolism. In: Maestroni GJM, Conti A, Reiter RJ, editors. Therapeutic potential of melatonin. Coopertown (USA): Front Horm Res. Basel. Karger, 1997: 107-114.
- (139) 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; 72(6):1435-1440.
- (140) Reiter RJ, Tang L, Garcia JJ, Munoz-Hoyos A. Pharmacological actions of melatonin in oxygen radical pathophysiology. *Life Sci* 1997; 60(25):2255-2271.
- (141) 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):367-372.
- (142) Halliwell B, Gutteridge JM. The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch Biochem Biophys* 1990; 280(1):1-8.
- (143) 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; 408(3):297-300.
- (144) 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; 408(3):297-300.
- (145) Poeggeler B, Reiter RJ, Hardeland R, Sewerynek E, Melchiorri D, Barlowwalden LR. Melatonin, a Mediator of Electron Transfer and Repair Reactions, Acts Synergistically with the Chain Breaking Antioxidants Ascorbate, Trolox and Glutathione. *Neuroendocrinological Letters* 1995; 17:87-92.
- (146) 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; 26(5):497-502.
- (147) Reiter RJ, Poeggeler B, Tan D-X, Chen L-D, Manchester L, Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15:103-116.
- (148) Guerrero JM, Reiter RJ. A brief survey of pineal gland-immune system interrelationships. *Endocrine Research* 1992; 16(2):91-113.
- (149) Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B* 1991; 8(2):211-218.
-

-
- (150) Daniels WMU, Reiter RJ, Melchiorri D, Sewerynek E, Pablos MI, Ortiz GG. Melatonin Counteracts Lipid Peroxidation Induced by Carbon Tetrachloride But Does Not Restore Glucose 6 Phosphatase Activity. *J Pineal Res* 1995; 19:1-6.
- (151) Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols and thiols. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:194S-200S.
- (152) Reiter RJ, Poeggeler B, Tan DX, Chen LD, Manchester LC, Guerrero JM. Antioxidant capacity of melatonin: A novel action not requiring a receptor. *Neuroendocrinol Lett* 1993; 15(2):103-116.
- (153) Mohan N, Sadeghi K, Reiter RJ, Meltz ML. The neuroendocrine melatonin inhibits cytokine mitogen and ionizing radiation induced nuclear factor kB. *Biochemistry and Molecular Biology International* 1995; 37(6):1063-1070.
- (154) Lissoni P, Barni S, Ardizzioia 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; 73(3):699-701.
- (155) Attia AM, Reiter RJ, Stokkan K-A, Mostafa MH, Soliman SA, El-Sebae A-K. Parathion (O,O-dimethyl-O-p-nitrophenyl phosphorothionate) induces pineal melatonin synthesis at night. *BRAIN RES BULL* 1991; 26:553-557.
- (156) Fu K, Hassett DJ, Cohen M.S. Oxidant stress in *Neisseria gonorrhoeae*: Adaptation and effects on L-(+)Lactate dehydrogenase activity. *Infect Immun* 1989; 57(7):2173-2178.
- (157) Johnson JR, Skubitz KM, Nowicki BJ, Jacques-Palaz K, Rakita RM. Nonlethal adherence to human neutrophils mediated by Dr antigen- specific adhesins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1995; 63(1):309-316.
- (158) Rosenberg M, Gutnick D, Rosenberg E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple methods for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Letters* 1980; 9:29-33.
- (159) Rosenberg M. Ammonium sulphate enhances adherence of *Escherichia coli* J5 to hydrocarbons and polystyrene. *FEMS Microbiol Letters* 1984; 25:41-45.
- (160) Lachica RV, Zink DL. Plasmid-associated cell surface charge and hydrophobicity of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 1984; 44(2):540-543.
- (161) Ofek I, Sharon N. Cómo se adhieren las bacterias a las células. *Mundo Científico* 1983; 3(25):564-566.
-

-
- (162) van Oss CJ. Phagocytosis as a surface phenomenon. *Annu Rev Microbiol* 1978; 32:19-39.
- (163) van Oss CJ, Mohn JF, Cunningham RK. Influence of various physicochemical factors on hemagglutination. *Vox Sang* 1978; 34(6):351-361.
- (164) Rosenberg M, Rottem S, Rosenberg E. Cell surface hydrophobicity of smooth and rough *Proteus mirabilis* strains as determined by adherence to hydrocarbons. *FEMS Microbiol Letters* 1982; 13:167-169.
- (165) Dahlback B, Hermansson M, Kjelleberg S, Norkrans B. The hydrophobicity of bacte. *Arch Microbiol* 1981; 128(3):267-270.
- (166) Ferreirós CM, Criado MT. Adhesive properties associated with the K99 antigen of *Escherichia coli*. *IRCS Medical Science* 1980; 10:917-918.
- (167) Gibbons RJ, Spinell DM, Skobe Z. Selective adherence as a determinant of the host tropisms of certain indigenous and pathogenic bacteria. *Infect Immun* 1976; 13(1):238-246.
- (168) Gibbons RJ, Hay DI. Adsorbed salivary acidic proline-rich proteins contribute to the adhesion of *Streptococcus mutans* JBP to apatitic surfaces. *J Dent Res* 1989; 68(9):1303-1307.
- (169) Stendahl O, Tagesson C, Edebo M. Partition of *Salmonella typhimurium* in a two-polymer aqueous phase system in relation to liability to phagocytosis. *Infect Immun* 1973; 8(1):36-41.
- (170) Rosenberg M, Bar-Ness GR, Barki M, Goldberg S. Hydrophobic interactions as a basis for interfering with microbial adhesion. *Adv Exp Med Biol* 1996; 408:241-248.
- (171) Rutter PR, Leech R. Factors influencing the deposition and growth of oral organisms on hard surfaces. *J Dent* 1979; 7(2):161-168.
- (172) Perez PF, Minnaard Y, Disalvo EA, De Antoni GL. Surface properties of bifidobacterial strains of human origin. *Appl Environ Microbiol* 1998; 64(Jan.):21-26.
- (173) Saito T, Takatsuka T, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Adherence of oral streptococci to an immobilized antimicrobial agent. *Arch Oral Biol* 1997 1997; 42(Aug.):539-545.
- (174) Marin ML, Benito Y, Pin C, Fernandez MF, Garcia ML, Selgas MD et al. Lactic acid bacteria: hydrophobicity and strength of attachment to meat surfaces. *Lett Appl Microbiol* 1997; 24(Jan.):14-18.
-

-
- (175) Plásmidos de resistencia: influencia en la hidrofobicidad de superficie en *Escherichia coli*. 83 Sep 6; Valladolid: Sociedad Española de Microbiología., 1983.
- (176) Ferreiros CM, Criado MT, Sainz V, Carballo J, del Rio C, Suarez B. Evaluation of hydrophobicity and adherence of *Neisseria meningitidis* strains and a study of their correlation by analysis of alterations induced by antibiotics. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1986; 137B(Jul-Aug):37-45.
- (177) Lindahl M, Faris A, Wadstrom T, Hjerten S. A new test based on 'salting out' to measure relative surface hydrophobicity of bacterial cells. *Biochim Biophys Acta* 1981; 677:471-476.
- (178) Pembrey RS, Marshall KC, Schneider RP. Cell surface analysis techniques: What do cell preparation protocols do to cell surface properties? *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(7):2877-2894.
- (179) Criado MT, Ferreiros CM, Sainz V. Studies on the implication of surface hydrophobicity in the adherence of *Neisseria meningitidis* to buccal epithelial cells. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1986; 175:27-34.
- (180) Jennings MP, Hood DW, Peak IR, Virji M, Moxon ER. Molecular analysis of a locus for the biosynthesis and phase-variable expression of the lacto-N-neotetraose terminal lipopolysaccharide structure in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* 1995; 18(Nov.):729-740.
- (181) Gwynn MN, Webb TL, Rolinson GN. Regrowth of *Pseudomonas aeruginosa* and other bacteria after the bactericidal action of carbenicillin and other beta-lactam antibiotics. *J Infect Dis* 1981; 144(3):263-269.
- (182) Peterson PK, Quie PG. Bacterial surface components and the pathogenesis of infectious diseases. *Annu Rev Med* 1981; 32:29-43.
- (183) Chopra I. Antibiotics and bacterial adhesion. *J Antimicrob Chemother* 1986; 18(5):553-554.
- (184) West TE, Lewis BA, Apicella MA. Immunological characterization of an exopolysaccharide from the *Staphylococcus aureus* strain Smith diffuse. *J Gen Microbiol* 1987; 133 (Pt 2):431-438.
- (185) Svanborg EC, Bjursten LM, Hull R, Hull S, Magnusson KE, Moldovano Z et al. Influence of adhesins on the interaction of *Escherichia coli* with human phagocytes. *Infect Immun* 1984; 44(Jun.):672-680.
- (186) Ernster L, Forsmark P, Nordenbrand K. The mode of action of lipid-soluble antioxidants in biological membranes. Relationship between the effects of
-

-
- ubiquinol and vitamin E as inhibitors of lipid peroxidation in submitochondrial particles. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1992; Spec No:548-551.
- (187) Uberos J, Molina A, Liébana J, Agustín MC, Muñoz A. The influence of different concentrations of melatonin on the cell-surface hydrophobic characteristics of *Neisseria meningitidis*. *Lett Appl Microbiol* 2000; 31:294-298.
- (188) Ellis RP, Vorhies MW. Effect of supplemental dietary vitamin E on the serologic response of swine to an *Escherichia coli* bacterin. *J Am Vet Med Assoc* 1976; 168(3):231-232.
- (189) Friedman A, Bartov I, Sklan D. Humoral immune response impairment following excess vitamin E nutrition in the chick and turkey. *Poult Sci* 1998; 77(7):956-962.
- (190) Hogan JS, Weiss WP, Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS, Williams SN. Vitamin E as an adjuvant in an *Escherichia coli* J5 vaccine. *J Dairy Sci* 1993; 76(2):401-407.
- (191) Lissoni P, Tisi E, Barni S, Ardizzoia A, Rovelli F, Rescaldini R et al. Biological and clinical results of a neuroimmunotherapy with interleukin-2 and the pineal hormone melatonin as a first line treatment in advanced non-small cell lung cancer. *Br J Cancer* 1992; 66:155-158.
- (192) Lissoni P, Tisi E, Brivio F, Ardizzoia A, Crispino S, Barni S et al. Modulation of interleukin-2-induced macrophage activation in cancer patients by the pineal hormone melatonin. *J Biol Reg Hom Agents* 1991; 5:154-156.
- (193) Rosenberg M. Isolation of pigmented and nonpigmented mutants of *Serratia marcescens* with reduced cell surface hydrophobicity. *J Bacteriol* 1984; 160(Oct.):480-482.
- (194) Ferreiros CM, Criado MT, Sainz V, Suarez B, Carballo J, Del Rio MC. Changes in surface hydrophobicity and charge in *Neisseria meningitidis* and their correlation with the association to phagocytic cells. *Rev Esp Fisiol* 1989; 45(Jun):105-109.
- (195) Withyachumnarnkul B, Nonaka KO, Attia AM, Reiter RJ. Changes in indole metabolism in organ cultured rat pineal glands induced by interferon-gamma. *J Pineal Res* 1990; 8:313-322.
- (196) Reiter RJ. Free radicals, melatonin, and cellular antioxidative defense mechanisms. In: Gupta D, Wollmann HA, Fedor-Fregbergh PG, editors. *Pathophysiology of immune-neuroendocrine communications circuit*. Stuttgart: Mattes Verlag, 1994: 135-160.
-

-
- (197) Tay CCK, Glasier AF, Illinworth PJ, Baird DT. Abnormal twenty-four hour pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion and the response to naloxone in women with hyperprolactinaemic amenorrhoea. *Clin Endocrinol* 1993; 39:599-606.
- (198) Li JC, Xu F. Influences of light-dark shifting on the immune system, tumor growth and life span of rats, mice and fruit flies as well as on the counteraction of melatonin. *Biol Signals* 1997; 6:77-89.
- (199) Pintor M, Ferreiros CM, Criado MT. Characterization of the transferrin-iron uptake system in *Neisseria meningitidis*. *FEMS Microbiol Letters* 1993; 112(Sep):159-165.
- (200) Gomez JA, Agra C, Ferron L, Powell N, Pintor M, Criado MT et al. Antigenicity, cross-reactivity and surface exposure of the *Neisseria meningitidis* 37 kDa protein (Fbp). *Vaccine* 1996; 14(Oct):1340-1346.
- (201) Maestroni GJ. The immunoneuroendocrine role of melatonin. *J Pineal Res* 1993; 14(1):1-10.
- (202) Maestroni GJ. Melatonin as a therapeutic agent in experimental endotoxic shock. *J Pineal Res* 1996; 20(2):84-89.
- (203) Di Stefano A, Paulesu L. Inhibitory Effect of Melatonin on Production of IFN Gamma or TNF Alpha in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Some Blood Donors. *J Pineal Res* 1994; 17:164-169.
- (204) Maestroni GJ, Conti A. Anti-stress role of the melatonin-immuno-opioid network: evidence for a physiological mechanism involving T cell-derived, immunoreactive beta-endorphin and MET-enkephalin binding to thymic opioid receptors. *Int J Neurosci* 1991; 61(3-4):289-298.
- (205) Golombek DA, Escolar E, Burin LJ, De Brito Snachez MG, Cardinali DP. Time-dependent melatonin analgesia in mice: Inhibition by opiate or benzodiazepine antagonism. *Eur J Pharmacol* 1991; 194:25-30.
- (206) Zaidan R, Geoffriau M, Brun J, Taillard J, Bureau C, Chazot G et al. Melatonin is able to influence its secretion in humans: Description of a phase-response curve. *Neuroendocrinol* 1994; 60:105-112.
- (207) Pang CS, Pang SF. High affinity specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin by spleen membrane preparations of chicken. *J Pineal Res* 1992; 12:167-173.
- (208) Rodríguez AB, Ortega E, Lea RW, Barriga C. Melatonin and the phagocytic process of heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Mol Cell Biochem* 1997; 168:185-190.
-

- (209) Criado MT, Del Rio MC, Ferreiros CM, Pintor M, Sainz V, Carballo J. Iron and outer membrane proteins in the susceptibility of *Neisseria meningitidis* to human serum. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 58(Jul):145-150.
- (210) Criado MT, Pintor M, Ferreiros CM. Iron uptake by *Neisseria meningitidis*. *Res Microbiol* 1993; 144(Jan):77-82.