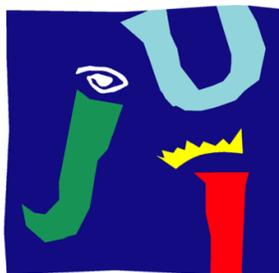


Facultat de Ciències de la Salut

Universitat Jaume I



**UNIVERSITAT
JAUME·I**

**Efecto de los arándanos sobre el estado
oxidativo de la leche en madres con mastitis**

TESIS DOCTORAL

Dña. Cristina Abad García

Castellón, 2017

Tesis Doctoral

Efecto de los arándanos sobre el estado oxidativo de la leche en madres con mastitis

**Tesis presentada para optar al Grado de Doctora por
Doña Cristina Abad García, licenciada en Farmacia, con DNI: 19003705-R**

Autora: Cristina Abad García

Castellón, 2017

Directoras:

Profesora Dra. Dña. María Muriach Saurí

Profesora Dra. Dña. Victoria Valls Bellés

Dra. María Muriach Saurí, profesora Contratada Doctora del Área de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Jaime I de Castellón.

Dra. Victoria Valls Bellés, profesora Asociada del Área de Fisiología. Facultad de Medicina, Universidad Jaime I de Castellón.

INFORMAN que: **Doña Cristina Abad García**, licenciada en Farmacia por la Universidad CEU Cardenal Herrera de Valencia ha realizado bajo nuestra dirección, en el Área de Fisiología de la Universidad de Castellón el presente trabajo titulado: ***“Efecto de los arándanos sobre el estado oxidativo de la leche en madres con mastitis”*** y autorizan su presentación como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctora.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman el presente informe, en Castellón, 16 de mayo de 2017:



Dra. María Muriach Saurí



Dra. Victoria Valls Bellés

A mis padres y hermanos.

A Mónica.

A mis hijos, Diego y Balma.

Agradecimientos

Ahora que por fin diviso el final de esta aventura, no sería justa si no reconociera que esta tesis doctoral no es solo fruto de mi esfuerzo y trabajo personal, sino que para llegar hasta aquí he tenido la ayuda de muchas personas, tanto en lo profesional como en lo personal, por lo que desde estas líneas me gustaría mostrar mi agradecimiento a todas ellas.

A la Dra. María Muriach Saurí y a la Dra. Victoria Valls Bellés por su tutela y dirección. A María, con la que inicié esta aventura hace unos cuantos años, gracias por tu ayuda y dedicación, sobre todo al final de este camino. A Victoria, que llegó en el momento justo para darle un impulso a este proyecto, gracias por tu esfuerzo y experiencia. A las dos, a pesar de las dificultades (que no han sido pocas): ¡muchas gracias!

A la Dra. Amalia Nácher, excelente pediatra y mejor persona aún, gracias por colaborar en la recogida de muestras, por tu generosidad y tu dedicación, por estar siempre ahí, por animarme y, sobre todo, por implicarte en este proyecto desde el primer día y empeñarte en que esta tesis saliera adelante. Sin tu ayuda no hubiera sido posible.

A la Dra. M.^a Teresa Hernández, por haber aceptado colaborar en este proyecto y haber participado en la recogida de muestras.

Al Dr. Pablo Baliño, gracias por dedicarme tu tiempo, por tus ánimos, por esa energía tan positiva y por tus prácticos consejos. Cuánta razón cuando me decías: “Cris, tu escribe, escribe y escribe... que luego ya lo arreglaremos”. Gracias también por tu ayuda en el laboratorio.

Al futuro Dr. Carlos Guerrero, trabajador incansable con el que he compartido muchas horas de laboratorio y del que he aprendido todo lo que sé de investigación. Gracias por tu dedicación siempre desinteresada. Tengo que reconocerte que echaré de menos esos ratos en el laboratorio, así que no dudes en llamarme si en tu tesis necesitas sacar los *barquitos a navegar*.

A Hermelinda, gracias por tu absoluta disponibilidad, y por tu esfuerzo y trabajo en mis ausencias en la farmacia.

A todas las madres que generosamente contribuyeron en este estudio con su participación.

A mi amiga Sandra Brunori, gracias por la portada, has captado perfectamente la idea que yo llevaba, ¡¡¡me encanta!!!

A mis amigas, María Segarra y Teresa García, porque sois la familia que se escoge, por vuestros ánimos, porque siempre estáis cuando os necesito, y habéis compartido conmigo todo este camino. Esta tesis ha dado para varios “Charquitos” y un viaje a París.

A mi prima, la Dra. Marta Pilar Montañez por tu disposición, dedicación y trabajo para que esta tesis tomara forma. Si no hubiese sido por ti, aún estaría peleándome con las sangrías, los encabezados y los pies de página. Gracias por tus correcciones, por tus sabios consejos, cada segundo hablado contigo lo he aprovechado; y por acompañarme en la recta final de esta aventura.

A mis hermanos Manuel y Catalina, por estar ahí siempre y cuidar de mis hijos cuando lo he necesitado.

A mi hermana Teresa, con la que comparto profesión, gracias por haber supervisado mi trabajo, por saber escuchar, por tu generosidad y ayuda incondicionales en todos los momentos importantes de mi vida. Sabes que esta tesis lleva también tu nombre.

A Mónica, mi amiga y compañera de vida, por animarme y apoyarme en todos mis proyectos, especialmente en este. Gracias por estar siempre a mi lado.

A mis hijos Diego y Balma, porque con Diego descubrí la lactancia y con Balma la sigo disfrutando. Vosotros habéis sido el mejor motivo para terminarla.

Y, por último, como no podía ser de otra manera, a mis padres, Manolo y Chelo, por ser un ejemplo de cariño, de trabajo, de esfuerzo y de perseverancia. A mi padre, al que admiro por su forma de disfrutar la vida y que tanto me ha enseñado, gracias por apoyarme siempre y animarme a conseguir todo aquello que me propongo. Y como al lado de un hombre genial, siempre hay una gran mujer... gracias mamá, porque eres parte fundamental de esta tesis, porque sin tu paciencia, tu cariño, tu ayuda con los niños y tu preocupación constante no hubiera llegado hasta aquí. No hay suficientes palabras para agradeceros todo lo que habéis hecho y seguís haciendo por mí... ¡¡¡os quiero!!!

ÍNDICE

Índice de figuras.....	21
Índice de tablas.....	23
Abreviaturas.....	25
I. INTRODUCCIÓN	31
1. METABOLISMO OXIDATIVO	32
1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS.....	32
1.2 RADICALES LIBRES.....	32
1.2.1 CONCEPTO DE RADICALES LIBRES	32
1.2.2 CLASES DE RADICALES LIBRES.....	33
1.2.2.1 Radicales libres más relevantes.....	34
1.2.2.2 Especies reactivas, no radicales.....	36
1.2.3 FUENTES DE RADICALES LIBRES.....	37
1.2.3.1 Fuentes endógenas.....	37
1.2.3.2 Fuentes exógenas	42
1.2.4 PAPEL FISIOPATOLÓGICO DE LOS RADICALES LIBRES.....	44
1.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO A BIOMOLÉCULAS	45
1.3.1 CONCEPTO DE ESTRÉS OXIDATIVO	45
1.3.2 DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS.....	46
1.3.2.1 Daño oxidativo a lípidos	46
1.3.2.1.1 Productos de la peroxidación de lípidos.....	47
1.3.2.2 Daño oxidativo a proteínas.....	48
1.3.2.3 Daño oxidativo a glúcidos.....	49
1.3.2.4 Daño oxidativo al ADN.....	50
1.4 ANTIOXIDANTES	52

1.4.1	CONCEPTO DE ANTIOXIDANTE	52
1.4.2	CLASIFICACIÓN DE ANTIOXIDANTES	53
1.4.2.1	Tipos de antioxidantes desde un punto de vista fisiológico	53
1.4.2.2	Tipos de antioxidantes desde un punto de vista bioquímico	55
1.4.2.2.1	<i>Antioxidantes enzimáticos</i>	55
1.4.2.2.2	Antioxidantes no enzimáticos o “scavengers” de radicales libres	58
1.4.3.	PAPEL DE LA DIETA EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	71
2.	ALIMENTACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	74
2.1	ALIMENTACIÓN DURANTE LA LACTANCIA	74
2.2	ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA LACTANCIA	77
3.	LECHE HUMANA, COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.....	78
3.1	TIPOS DE LECHE MATERNA.....	78
3.2	COMPONENTES DE LA LECHE HUMANA.....	79
3.3	CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA	91
4.	MASTITIS.....	94
5.	PROPIEDADES NUTRITIVAS Y APORTE ANTIOXIDANTE DE LOS ARÁNDANOS	103
5.1	ASPECTOS BOTÁNICOS (TAXONOMÍA).....	103
5.2	UTILIZACIÓN EN EL MERCADO O LA INDUSTRIA	104
5.3	COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y COMPUESTOS CARACTERÍSTICOS.....	105
5.4	EFFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS ARÁNDANOS EN LA SALUD.....	110
5.4.1	ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	110
5.4.2	ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.....	111
5.4.3	ACTIVIDAD PROTECTORA FRENTE A ENFERMEDADES DEGENERATIVAS Y RIESGO CARDIOVASCULAR	112

4.2.2.1.1 Estudio del daño inducido a macromoléculas en la leche de la madre	132
4.2.2.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante en la leche	135
4.2.2.1.3 Determinación de la defensa antioxidante.....	137
4.2.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	142
V. RESULTADOS.....	147
1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTICIPANTES.....	149
2. INGESTA MATERNA HABITUAL ESTIMADA	149
2.1. MACRONUTRIENTES	149
2.2. MICRONUTRIENTES	152
3. ANÁLISIS DE LA LECHE MATERNA	155
3.1. ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE MATERNA.....	155
3.1.1 ESTUDIO DEL DAÑO INDUCIDO A MACROMOLÉCULAS EN LA LECHE MATERNA.....	155
3.1.1.1 Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas (CGC)	155
a) Efecto de la mastitis sobre el CGC en leche.....	155
b) Efecto de la administración de arándanos sobre el CGC en leche	156
3.1.1.2 Determinación de la concentración de MDA por HPLC.....	157
a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de MDA en leche	157
b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de MDA en leche.....	157
3.1.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE	158
3.1.2.1 Método del ABTS ^{•+}	159
a) Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método ABTS ^{•+}	159

b) Efecto de la administración de arándanos sobre la CAT por el método de ABTS**	159
3.1.2.2 Método del FRAP	161
a) Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método del FRAP	161
b) Efecto de la administración de arándanos sobre la CAT por el método del FRAP	161
3.1.3 DETERMINACIÓN DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE	162
3.1.3.1 Determinación de polifenoles totales en la leche (Método de Folin-Ciocalteu)	163
a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de polifenoles totales	163
b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de polifenoles totales	163
3.1.3.2 Contenido en glutatión (GSH)	165
a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de GSH en la leche	165
b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de GSH en la leche	165
3.1.3.3 Actividad glutatión peroxidasa (GPx)	166
a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de GPx en la leche	166
b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de GPx en la leche	167
VI. DISCUSIÓN	171
1. VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LAS MADRES	173
2. VALORACIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE MATERNA	177
2.1 ESTUDIO DEL DAÑO INDUCIDO A MACROMOLECULAS EN LECHE MATERNA	177
2.1.1 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE CGC EN PROTEÍNAS	177
2.1.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MDA EN LECHE	178
2.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE	180
➤ DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT)	180

2.2.1 MÉTODO ABTS**	181
2.2.2 MÉTODO FRAP	183
2.3 DETERMINACIÓN DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE DE LA LECHE	183
2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE POLIFENOLES TOTALES	184
2.3.2 ESTUDIO DEL SISTEMA GLUTATIÓN	186
VII. CONCLUSIONES.....	191
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	197
ANEXOS.....	235
ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO ..	237
ANEXO 2 . CEIC HOPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓN	240
ANEXO 3 . CEIC HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. PESET DE VALENCIA	242
ANEXO 4. REGISTRO DIETÉTICO DE 24 HORAS	243

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Generación de especies oxigénicas reactivas en la reducción monovalente del oxígeno y en la cadena de transporte electrónico*

Figura 2. *Sistema hidroxilante microsomal hepático*

Figura 3. *Esquema de la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa*

Figura 4. *Sistema oxidante en las células fagocitarias*

Figura 5. *Esquema de los mecanismos implicados en la lipoperoxidación*

Figura 6. *Estructura química del MDA*

Figura 7. *Daño oxidativo al ADN y mecanismos de destrucción celular*

Figura 8. *Estructura química del glutatión*

Figura 9. *Síntesis de GSH*

Figura 10. *Representación del sistema glutatión*

Figura 11. *Estructura química del α -tocoferol*

Figura 12. *Reacción del α -tocoferol con los peróxidos*

Figura 13. *Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina E*

Figura 14. *Estructura química del ácido ascórbico*

Figura 15. *Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina C*

Figura 16. *Estructura química básica de los flavonoides*

Figura 17. *Actuación de los polifenoles como “scavenger” de los radicales libres*

Figura 18. *Estructura química de los carotenoides*

Figura 19. *Mecanismos de actividad antioxidante de carotenoides*

Figura 20. *Esquema del metabolismo oxidativo y su relación con la dieta*

Figura 21. *Representación esquemática del epitelio y los conductos mamarios en condiciones fisiológicas (A) y en una situación de mastitis (B)*

Figura 22. *Vaccinium macrocarpon*

Figura 23. *Proantocianidina oligomérica*

Figura 24. *Ejemplo de un cromatograma de la determinación de MDA*

Figura 25. *Ejemplo de un cromatograma de la determinación de GSH*

Figura 26. *Ejemplo de un registro de la determinación de la actividad GPx*

Figura 27. *Ingesta de Macronutrientes en los grupos C, CA, M y MA*

Figura 28. Efecto de la mastitis sobre el CGC en proteínas

Figura 29. Variación del CGC en leche medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

Figura 30. Efecto de la mastitis sobre la concentración de MDA

Figura 31. Variación de la concentración de MDA medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

Figura 32. Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método ABTS^{•+}

Figura 33. Variación de la CAT por el método ABTS^{•+} medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

Figura 34. Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método FRAP

Figura 35. Variación de la CAT medida con el método FRAP en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

Figura 36. Efecto de la mastitis sobre la concentración de polifenoles totales

Figura 37. Variación de la concentración de polifenoles totales medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

Figura 38. Efecto de la mastitis sobre la concentración de GSH

Figura 39. Variación de la concentración de GSH medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

Figura 40. Efecto de la mastitis sobre la actividad GPx.

Figura 41. Variación de la actividad GPx medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies reactivas más relevantes

Tabla 2. Clasificación según Thomsen

Tabla 3. Composición nutricional del arándano rojo.

Tabla 4. Composición de compuestos fenólicos

Tabla 5. Valor nutricional de los Arándanos desecados “Hacendado”

Tabla 6. Características antropométricas

Tabla 7. Ingesta de macronutrientes

Tabla 8. Ingesta media de macronutrientes en función de la ingesta calórica

Tabla 9. Distribución del consumo de grasas

Tabla 10. Ingesta de vitaminas

Tabla 11. Ingesta de minerales

Tabla 12. Contenido de grupos carbonilo en leche medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo

Tabla 13. Concentración de MDA en leche medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo

Tabla 14. CAT medida con el método ABTS^{•+} en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo

Tabla 15. CAT medida con el método FRAP en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo

Tabla 16. Concentración de polifenoles totales medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo

Tabla 17. Concentración de GSH medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo

Tabla 18. Actividad de la GPx medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo

ABREVIATURAS

α	Alfa
ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGEs	Productos avanzados de glicación
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
β	Beta
BER	Reparación de escisión de base
BR	Inversión de base
Ca	Calcio
CAT	Capacidad antioxidante Total
°C	Grados centígrados
C	Control
CA	Control con arándanos
CGA	Ácido clorogénico
CGC	Contenido en grupos carbonilo
cm	Centímetros
CSA	Control sin arándanos
Cl	Cloro
ClH	Acido Clorhídrico
Cu	Cobre
CuZn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de Cobre y Zinc
Da	Dalton
DAD	Detector diodos
D.S.	Desviación standard
DHA	Ácido docosaheptaenoico
dL	decilitro

DNFH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DT-diaforasa	NADPH-quinona oxidoreductasa
e⁻	electrón
EC-SOD	Superóxido dismutasa extracelular
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EFV	Factor de crecimiento endotelio vascular
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPA	Acido eicosapentanoico
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAP	Factor activador de plaquetas
Fe	Hierro
FeCl3	Cloruro férrico
FeSO4	Sulfato ferroso
FGF	Factor estimulante de fibroblastos
FLD	Detector de fluorescencia
FRAP	Capacidad antioxidante mediante reducción férrica (Ferric reduction antioxidant power)
g	gramo
GCSF	Factor estimulador de granulocitos
GPx	Glutatió peroxidasa
GSH	Glutatió reducido
GSSG	Glutatió oxidado
H₂O	Agua
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HC	Hidratos de carbono
HGF	Factor estimulante de hepatocitos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
Ig	Inmunoglobulina
IGF-1	Factor de crecimiento insulínico tipo I

IL	Interleukina
IMC	Índice de masa corporal
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IOM	Instituto de Medicina de Estados Unidos
k	Kappa
K	Potasio
Kcal	Kilocaloria
kDa	kiloDalton
L	litro/leche
LDH	Lactato deshidrogenasa
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
M	Mastitis
MA	Mastitis con arándanos
MDA	Malondialdehído
MDH	Malato deshidrogenasa
Mg	Magnesio
mg	miligramos
mL	mililitros
Mn	Manganeso
Mn-SOD	Superóxido dismutasa dependiente de manganeso
MSA	Mastitis sin arándanos
N	Normal
Na	Sodio
Na₂CO₃	Carbonato sódico
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
NER	Reparación de escisión de nucleótido
NF-kB	Factor de transcripción nuclear kappa de células B activadas
nm	nanómetros
nMol	nanomoles

NMDA	N-metil D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO[•]	Óxido nítrico
NO₂	Dióxido de nitrógeno
NO₂⁻	Nitrito
NO₃⁻	Nitrato
N₂O₃	Trióxido dinitrógeno
NOS	Especies reactivas del nitrógeno
O₂	Oxígeno molecular
¹O₂	Oxígeno singlete
O₂^{•-}	Anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO⁻	Peroxinitrito
p	significación estadística
PAC_s	Proantocianidinas
PGE	Prostaglandinas
pO₂	Presión parcial de Oxígeno
Q₁₀	Complejo quinona-semiquinona-ubiquinol
QH₂	Ubiquinol
rpm	Revoluciones por minuto
RDI/RDA	Ingesta Dietética Recomendadas (Recommended Dietary Allowances)
REDOX	Oxido-reducción
RLs	Radicales libres
RN	Recién nacido
RO[•]	Radical alcoxilo
ROH	Radical hidroxilo
ROO[•]	Peroxilo
ROOH	Radical alquilo
ROS	Especies reactivas del oxígeno, especies oxigénicas reactivas
s	Segundos

S	Azufre
Se	Selenio
Se-GPx	Glutación peroxidasa selenio dependiente
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TEAC	Capacidad antioxidante medida en equivalentes de Trolox
TLR4	Proteína que al activarse conduce a la vía de señalización NF-KB
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPTZ	2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
UI	Unidades internacionales
UV	Ultravioleta
vit	vitamina
v	volumen
Zn	Cinc
µg	microgramo
µL	microlitro
µMol	micromoles
\bar{x}	media estadística

I. Introducción

1. METABOLISMO OXIDATIVO

1.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

El metabolismo oxidativo es, para los seres de vida aerobia, la base de procesos fisiológicos indispensables como la respiración celular, la fagocitosis, el transporte de moléculas a través de la membrana, la acción enzimática o los procesos biogénicos. Este metabolismo, al utilizar el O₂ como aceptor final de electrones, posee una elevada eficiencia energética, pero debido a sus características paramagnéticas, se generan sustancias potencialmente tóxicas y muy reactivas que inducen el daño oxidativo.

De hecho, los avances en el conocimiento del metabolismo oxidativo han permitido demostrar que el envejecimiento celular y muchas enfermedades crónicas (enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, cáncer, hipercolesterolemia, diabetes, Alzheimer, fibrosis quística, cataratas y artritis reumatoides, entre otras) tienen relación directa o indirecta con el daño oxidativo (Stadtman, 1997; Herrera et al., 2003; Muriach et al., 2006; Muriach et al., 2010; Burton GJ & Jauniaux E, 2011; Fewtrell MS, 2011; Muriach et al., 2014; Sasabe, 2014; Arribas et al., 2016).

1.2 RADICALES LIBRES

1.2.1 Concepto de Radicales Libres

Los radicales libres (RLs) se definieron inicialmente como estructuras químicas capaces de existencia independiente que, por contener un electrón desapareado en el orbital más externo de su molécula, son inestables, lo que los hace muy reactivos. Buscando el equilibrio intercambian electrones con las moléculas de su entorno y provocan, como resultado, la aparición de nuevas moléculas oxidadas. Estas, a su vez, al donar o perder un electrón en su capa más externa pueden transformarse en nuevos RLs. Producen una reacción en cadena donde cada nuevo RL le roba un electrón a otra molécula. Esta situación da lugar al llamado “estrés oxidativo”

(Betteridge DJ, 2000), que se define como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies H, 1997).

1.2.2 Clases de Radicales Libres

La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de prooxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los antioxidantes. En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres (RLs) proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno, (como el anión superóxido y el radical hidroxilo), por este motivo muchos autores los llaman “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Estas dos denominaciones (RLs y ROS), no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales (como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso). Sin embargo, lo habitual es referirse a ellos indistintamente como **RLs, ROS** o simplemente **oxidantes**.

Existen además, las especies reactivas de nitrógeno (**NOS**) que derivan del metabolismo del óxido nítrico. El óxido nítrico, debido al electrón desapareado que presenta en su orbital más externo, es por sí mismo un radical, pero, además, en su metabolismo tienen lugar reacciones con el oxígeno molecular, ROS, metales de transición o tioles que darán lugar a la producción de NOS como el peroxinitrito (ONOO⁻), trióxido dinitrógeno (N₂O₃), dióxido de nitrógeno (NO₂), o nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻), y destaca entre ellas el primero por su alta reactividad. Por lo tanto, también existe el concepto de estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada del óxido nítrico y las especies reactivas del nitrógeno que de él derivan (Hausladen A & Stamler JS, 1999). Esta situación puede ocurrir *in vivo* en distintas patologías, entre ellas las asociadas a procesos inflamatorios, neurotoxicidad, isquemias o durante la neurotransmisión que tiene lugar mediante activación de receptores NMDA (Klatt P & Lamas S, 2000; Brown GC, 2010; Muriach et al., 2010; Cipak Gasparovic A et al., 2016).

Tanto los ROS como los NOS incluyen moléculas radicales y moléculas no radicales (Halliwell B, 1996; Halliwell B, 2012), son los más relevantes los descritos a continuación (Tabla 1).

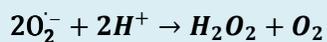
Radicales	ROS	Anión superóxido	$O_2^{\bullet -}$
		Radical Hidroxilo	OH^{\bullet}
		Radical alcoxilo	RO^{\bullet}
		Peroxilo	ROO^{\bullet}
	NOS	Oxido Nítrico	NO^{\bullet}
No Radicales	ROS	Peróxido de Hidrógeno	H_2O_2
		Oxígeno singlete	1O_2
	NOS	Peroxinitrito	$ONOO^-$

Tabla 1. *Especies reactivas más relevantes*

1.2.2.1 Radicales libres más relevantes

El **anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$)** se produce en la cadena de transporte electrónico de las mitocondrias (Dröse S & Brandt U, 2012) en reacciones catalizadas por oxidasas, hidrolasas o deshidrogenasas (Korycka-Dahl M & Richardson T, 1980) y por acción del O_2 sobre la cisteína o la riboflavina (Viña et al., 1983). Es capaz de reaccionar con moléculas como quinonas, fenoles y otros radicales como el óxido nítrico (Halliwell B, 1996) y origina y/o propaga reacciones que dan lugar a otras especies oxigénicas reactivas mucho más tóxicas como el radical hidroxilo.

El superóxido se convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno, por ejemplo a través de una dismutación:



El **radical hidroxilo (OH^{\bullet})** es muy reactivo, tiene una vida media muy corta (10^{-9} s) y es capaz de interaccionar con todas las biomoléculas cercanas (Halliwell B, 2007; Pastor et al., 2000). Este radical se genera a través de distintos procesos, y es

el más importante en la formación del radical hidroxilo la llamada reacción de Fenton en la que intervienen compuestos metálicos (Fenton, 1894):



El **óxido nítrico (NO[•])** no es muy reactivo, tiene una vida media de 3 a 5 segundos y se produce durante la conversión de la L-arginina a L-citrulina. Esta reacción que es catalizada por la óxido-nítrico-sintetasa, es NADPH y oxígeno dependiente y tiene lugar en las mitocondrias de diversos tejidos (endotelial, nervioso, muscular y epitelial) (Li H & Poulos TL, 2005). El NO posee múltiples funciones y puede regular la fisiología, tanto en procesos agudos como a largo plazo, e inducir cambios celulares casi permanentes. La importancia de este radical deriva de su participación en reacciones críticas para el organismo, así como de sus dobles propiedades, ya que, en determinadas condiciones, puede actuar como antiinflamatorio a concentraciones bajas y como pro-inflamatorio cuando se encuentra en concentraciones elevadas (Grisham MB et al., 1999). El NO es precursor de compuestos muy activos como el peroxinitrito o el dióxido de nitrógeno que participan en procesos de lipoperoxidación de membranas y lipoproteínas. Pero también puede limitar la propagación de reacciones de oxidación lipídica con la formación de productos no radicales como los nitrosolípidos. Y es capaz de modular la respiración mitocondrial inhibiendo la citocromo C oxidasa, aumentar o disminuir el flujo sanguíneo y regular la unión del O₂ a la hemoglobina (Sansbury BE & Hill BG, 2014). Que actúe como prooxidante (promoviendo la disfunción tisular y celular con efectos pro inflamatorios) o como antioxidante (con propiedades reguladoras y antiinflamatorias) depende de su concentración, de la velocidad relativa de su formación, de la presencia de otros radicales y del lugar de formación (Rubbo H, 1998). En concentraciones bajas, el NO desarrolla importantes acciones reguladoras y antiinflamatorias. En concentraciones elevadas y en presencia de determinados metales de transición es capaz de provocar inactivación

enzimática y daños al ADN (capaz de provocar mutaciones y roturas) (Drögge W, 2002).

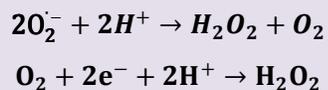
El **dióxido de nitrógeno (NO₂•)** que es producido en la reacción del óxido nítrico con el O₂ y en la descomposición del peroxinitrito (Postlethwait et al., 1995), es un radical muy activo, capaz de iniciar la peroxidación lipídica (Kaur H & Halliwell B, 1994).

El **radical peroxilo (ROO•)** deriva de la reacción del O₂ con los radicales hidrocarbonados lipídicos principalmente (Reed GA, 1987), es probablemente el radical más abundante y tiene una vida media de segundos (Cadenas E, 1989).

1.2.2.2 *Especies reactivas, no radicales*

El **peróxido de hidrógeno (H₂O₂)** no puede ser considerado un radical libre porque no tiene electrones desapareados en su orbital más externo, pero tiene gran facilidad de difusión a través de las membranas y es capaz de producir oxidación en zonas muy alejadas de su lugar de producción.

Es generado tras la dismutación del ión peróxido (Cheeseman and Slater, 1993; Frei, 1994), o por reducción directa de una molécula de O₂, por dos electrones (Sawyer, 1988; Fridovich, 1997):

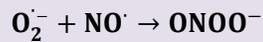


También puede originarse por reacciones químicas de autooxidación (Korycka-Dahi & Richarson, 1980) o como subproducto de determinadas acciones enzimáticas (glucosa oxidasa, monoamino oxidasa,...) (Nicotra et al., 2004).

El **oxígeno singlete ¹O₂**, es una forma excitada del oxígeno molecular que se forma por efecto de la luz solar sobre algunas moléculas y como subproducto de diversas reacciones enzimáticas en el organismo. Reacciona con facilidad con otras

moléculas, es de vida media muy corta (10^{-6} s) y oxida lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Ryter SW & Tyrrell RM, 1998).

El **peroxinitrito (ONOO^-)** es el resultado de la unión de anión superóxido y óxido nítrico (Miles et al., 1996), tal como se muestra en la siguiente reacción:



Es un potente intermediario oxidante capaz de inducir la peroxidación de lípidos y de degradar carbohidratos, oxidar lípidos, tioles y tio-éteres y nitrar la guanosina o los residuos de tirosina fragmentando la cadena del ADN (Beckman JS & Koppenol WH, 1996).

1.2.3 Fuentes de Radicales Libres

Los RLs pueden ser producidos en el organismo como subproductos de procesos metabólicos (fuentes endógenas) o proceder de fuentes externas (fuentes exógenas) como las radiaciones, el ozono, el humo del tabaco, los contaminantes ambientales, algunos productos químicos e incluso de la alimentación.

1.2.3.1 Fuentes endógenas

Las principales fuentes endógenas generadoras de radicales libres en la célula son:

a) *Cadena de transporte electrónico*

La cadena de transporte electrónico mitocondrial puede considerarse como la principal fuente de especies oxigénicas reactivas en el interior de la célula (Halliwell and Gutteridge, 1989; Lindsay and Astley, 2002; Fang et al., 2002; Alfadda and Sallam; 2012). Ello se debe a que su principal función es generar energía, puesto que el 95 % del oxígeno que respiramos es reducido a H_2O por la acción de la citocromo oxidasa-a-3 (último eslabón de la cadena de transporte electrónico), mediante un mecanismo en el que participan cuatro centros redox, proporcionando, además, la

principal fuente de energía (ATP) al organismo (Mathews & van Holde, 1998). Sin embargo, del 3-5% del oxígeno que respiramos puede dar lugar a la formación de especies oxigénicas reactivas, como consecuencia de la reducción monovalente de la molécula de oxígeno, tales como el radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), responsables de la toxicidad del oxígeno. En primer lugar, se describió la producción mitocondrial del peróxido de hidrógeno por Jensen en 1966, y posteriormente se demostró que la mayor parte del peróxido de hidrógeno mitocondrial, procedía de la dismutación del radical superóxido (Boveris & Cadenas, 1975). La generación del radical superóxido por la mitocondria se produce cuando los transportadores de la cadena respiratoria, localizados en la membrana mitocondrial interna, están altamente reducidos (Turrens and Boveris, 1980). La excepción en este caso la manifiesta el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), que no siendo un radical, entra a formar parte de importantes reacciones redox, dando lugar a la formación de especies mucho más reactivas. Por otra parte, también se puede formar el $O_2^{\bullet-}$ a nivel del complejo I y del complejo quinona-semiquinona-ubiquinol (Q_{10}) que actúan como aceptor de electrones (Figura 1) (Fridovich, 1978; Ames et al., 1993).

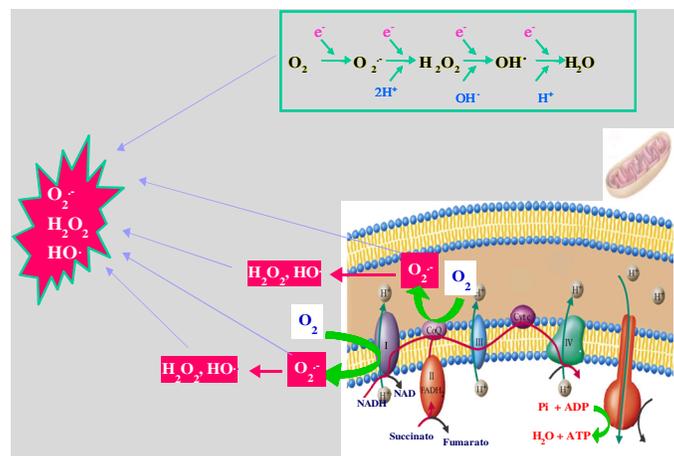


Figura 1. Generación de especies oxigénicas reactivas en la reducción monovalente del oxígeno y en la cadena de transporte electrónico. Valls-Bellés, 2001.

b) *Sistemas de transporte electrónico del retículo endoplásmico*

La fracción microsomal de la célula contiene el sistema de transporte electrónico no fosforilante. Estos sistemas de membrana contienen los citocromos P450 y b₅ que participan en diversas reacciones de hidroxilación y desaturación, produciendo ROS. Un sistema de hidroxilación lo constituyen los enzimas microsomales del citocromo P450, que se encargan de la metabolización de xenobióticos.

El sistema microsomal hepático (Figura 2) está constituido por una flavoproteína denominada NADPH-citocromo P450 reductasa, así como un citocromo microsómico, el P450. Un equivalente electrónico es transferido desde NADPH a la flavoproteína que contiene un grupo prostético FAD, al que reduce por completo. Posteriormente, los electrones son transferidos desde la flavoproteína reducida a la forma oxidada del citocromo P450 (Fe³⁺) para dar la forma reducida P450 (Fe²⁺), la cual reacciona con el O₂ formando el ión superóxido (Sevanian et al., 1990).

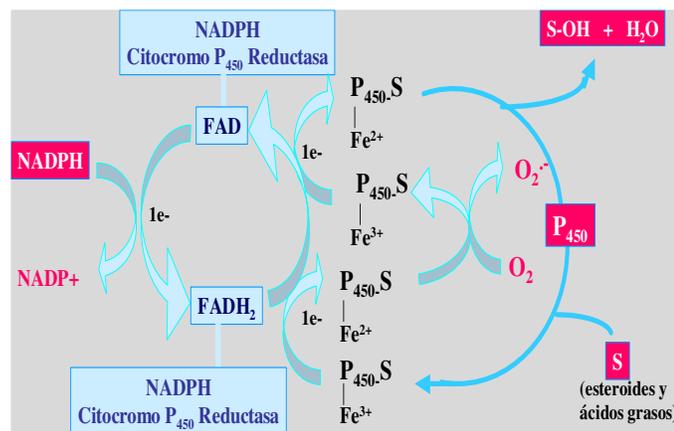


Figura 2. Sistema hidroxilante microsomal hepático, adaptado de Mataix, 2002.

c) *Diversas enzimas*

Las principales enzimas que contribuyen a la producción de especies oxigénicas reactivas son:

- El sistema hipoxantina/xantina oxidasa.
- Enzimas citosólicas solubles como son la aldehído oxidasa y la óxido nítrico sintasa que generan radicales libres durante su actividad catalítica.
- Enzimas que se encuentran unidas a la membrana plasmática como la ciclooxigenasa y la lipoxigenasa.

Con respecto al **sistema hipoxantina/xantina oxidasa**, en condiciones normales, la xantina deshidrogenasa oxida la hipoxantina a xantina y esta a ácido úrico, no produciendo especies oxigénicas reactivas, puesto que el NAD^+ actúa como aceptor de electrones (Kinnula et al., 1995). Pero en condiciones de hipoxia (como en un proceso isquémico o reperfusión), la xantina deshidrogenasa sufre una conversión a xantina oxidasa que cataliza la misma reacción, pero el oxígeno actúa como aceptor de electrones con la reducción del oxígeno molecular y formación del anión superóxido en primera instancia (Figura 3) y peróxido de hidrógeno en segunda (Valko et al., 2004).

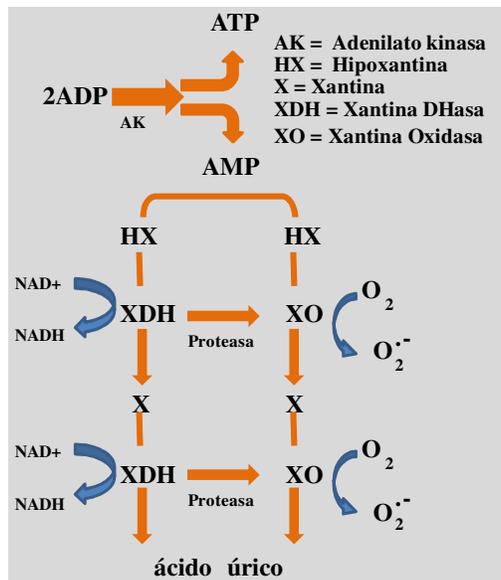


Figura 3. Esquema de la conversión de xantina deshidrogenasa en xantina oxidasa.

Valls-Bellés, 2001.

Con respecto a la enzima **óxido nítrico sintasa** existen tres isoformas: NOS neuronal (nNOS o NOS I), NOS inducible (iNOS o NOS II), NOS endotelial (eNOS o NOS III), que en las células produce uno de los radicales más relevantes en la regulación biológica: el óxido nítrico (Bredt et al., 1991; Lamas et al., 1992; Förstermann & Sessa et al., 2012).

Igualmente, la importancia que presentan las enzimas unidas a la membrana plasmática, tales como la **lipooxigenasa** y la **ciclooxigenasa**, en la generación de radicales libres como consecuencia del metabolismo del ácido araquidónico, para dar lugar a potentes productos biológicos, como son las prostaglandinas, los tromboxanos y los leucotrienos (Kim et al., 2008).

d) *Células fagocitarias activadas*

Las células fagocitarias (neutrófilos, monocitos, macrófagos, eosinófilos) poseen en la membrana plasmática la enzima NADPH oxidasa, que es una fuente importante de producción de radicales libres. Así, cuando se activan consumen gran cantidad de oxígeno que les permite generar directamente $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 como mecanismo para combatir a los microorganismos (Weiss & Lobuglio, 1982).

Además, dichas células por la acción de la óxido nítrico sintasa sobre la arginina intracelular generan óxido nítrico (NO^{\bullet}), como mecanismo de defensa. La combinación del $O_2^{\bullet-}$ con el NO^{\bullet} da lugar a la formación del $ONOO^-$, capaz de inducir peroxidación lipídica y producir lisis celular (Nathan & Xien, 1994) (Figura 4).

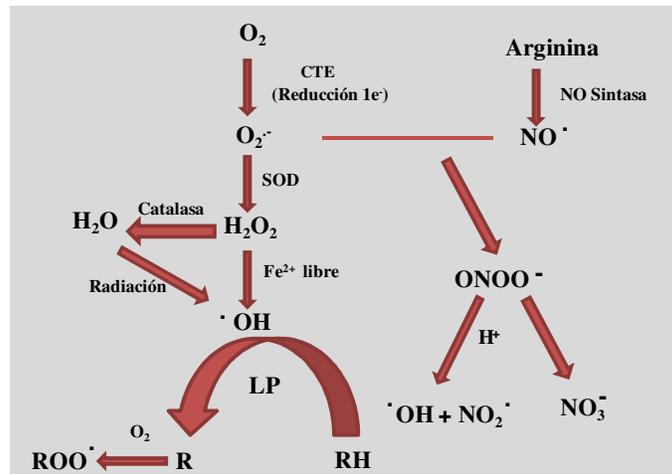


Figura 4. Sistema oxidante en las células fagocitarias. Valls-Bellés, 2001.

e) Autooxidación

La autooxidación de diferentes moléculas citoplasmáticas pueden dar lugar a especies oxigénicas reactivas. En general, se produce la formación del anión superóxido que, por una reacción de dismutación espontánea o enzimática, puede dar lugar a H_2O_2 .

1.2.3.2 Fuentes exógenas

Como se ha comentado anteriormente, también existe un origen exógeno de ROS. Las fuentes exógenas pueden ser:

a) Ambientales

Entre los factores ambientales se encuentran las radiaciones ionizantes, el ozono, el tabaco, los pesticidas, los contaminantes aéreos fotoquímicos o los hidrocarburos aromáticos. Estos agentes pueden poseer radicales libres, o bien convertirse en radicales mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación. La radiación ionizante puede causar daño a células vivas, incluyendo daño a ADN y mutación genética, muerte celular y cáncer (Riley, 1994). La mayoría de los efectos tóxicos de las radiaciones ionizantes es mediada por ROS (Tulard et

al., 2003). Los ROS se generan rápidamente a través de radiólisis de las moléculas de agua, así como de las reacciones secundarias que conducen a un aumento en los niveles de ROS, que puede persistir y difundirse dentro de la célula (Riley, 1994; Leach et al., 2001). Ejemplo de ello es que los radicales libres se pueden producir en respuesta a las radiaciones electromagnéticas, como los rayos gamma, que pueden escindir el agua y producir radicales hidroxilo (Halliwell, 1996; Betteridge, 2000).

b) *Nutricionales*

Se producen ante la presencia de contaminantes, aditivos, etc. Las sales de hierro y cobre promueven la formación de radicales libres generando H_2O_2 . Cuando un individuo absorbe una cantidad significativa de hierro dietético debido a un defecto genético, particularmente de hierro hemo, se convierte en un factor de riesgo para las enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer (Frei et al., 1990; Valls-Bellés, 2001).

c) *Farmacológicas*

Los xenobióticos han demostrado generar ROS en células por metabolización directa a intermediarios radicales primarios o por activación de fuentes endógenas de ROS (Rice-Evans & Burdon, 1993; Klaunig et al., 1997). La inducción de estrés oxidativo y el daño se han observado después de la exposición a xenobióticos de variadas estructuras químicas y modos de acción. Los compuestos clorados, los iones metálicos, los barbitúricos, los ésteres de forbol y algunos compuestos de proliferación de peroxisomas están entre las clases de compuestos que han demostrado inducir estrés oxidativo y daño oxidativo *in vitro* e *in vivo* (Klaunig et al., 1997). Compuestos quinónicos, incluyendo herbicidas como el paraquat, menadiona y una variedad bastante amplia de drogas usadas médicamente, pueden causar citotoxicidad debido a las especies oxigénicas reactivas generadas cuando estos compuestos sufren reacciones redox cíclicas con la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

Una de las drogas más ampliamente estudiada generadora de estos radicales libres es la doxorubicina o adriamicina (antibiótico de la familia de las antraciclinas), (Valls-Belles et al., 2006; Valls-Belles et al., 2008). Esta droga somete a una reducción de un electrón que genera el radical semiquinona en el complejo I de la mitocondria. El radical semiquinona de la adriamicina actúa como un reductor de oxígeno molecular, regenerando la droga nativa y produciendo el radical superóxido (Cadenas & Davies, 2000).

1.2.4 Papel fisiopatológico de los radicales Libres

Aunque tradicionalmente las ROS se han observado desde un punto de vista negativo para la función y viabilidad celular, éstas pueden jugar un papel importante en el origen de la vida y la evolución biológica con efectos beneficiosos en los organismos.

De hecho, los radicales libres desempeñan un papel fisiológico, son necesarios para el buen funcionamiento celular, y pueden actuar como segundos mensajeros, estimulando la proliferación celular y actuando como mediadores para la activación de las células, cuando se encuentran a bajas concentraciones (Park et al., 2011). Pero también pueden dar lugar a reacciones de oxidación indeseadas al acumularse, contra las que los organismos han tenido que desarrollar sistemas de defensa antioxidante que permiten su eliminación o la transformación en moléculas estables (Davies, 1995; Halliwell, 1996; Dröge, 2002; Liu et al., 2003; Halliwell, 2011).

En los últimos años se ha reconocido y reevaluado la función de las ROS. De hecho, no es fácil catalogar a las ROS o radicales libres como moléculas beneficiosas o dañinas. Según Jackson y colaboradores en 2002, todo depende del proceso celular que se analice. Por ejemplo, en la muerte celular por necrosis, a consecuencia de los mecanismos de isquemia-reperfusión, las ROS no son beneficiosas (Valls-Bellés et al., 2008), mientras que en la muerte celular por

apoptosis pueden ser vistas, de manera ambivalente, como dañinas o también como beneficiosas (Jackson et al., 2002).

El papel de las ROS en los procesos de inflamación también puede ser mixto. Así, se ha visto claramente su papel beneficioso en el ámbito proinflamatorio, ya que proporcionan una mejora en la respuesta inmune consiguiente a la infección; sin embargo, en trastornos como la artritis reumatoide, la respuesta inflamatoria inapropiada generada por ellos debe ser suprimida por dañina.

Ya sean perjudiciales o beneficiosas, los investigadores han llegado a la conclusión de que las especies oxígeno reactivas juegan un papel importante en los cambios de la modulación de la expresión génica y en la función celular, pudiendo ser utilizados estos cambios como biomarcadores del estrés oxidativo.

1.3 ESTRÉS OXIDATIVO Y DAÑO A BIOMOLÉCULAS

1.3.1 Concepto de estrés oxidativo

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (Sies, 1985). El estrés oxidativo puede producirse como consecuencia, bien de un incremento de las especies prooxidantes, bien de un descenso de las antioxidantes, o bien porque ambas situaciones se den simultáneamente.

De modo que, cuando se ocasiona este desequilibrio provocado por cualquiera de dichas causas, da como resultado un daño celular, ya que se producen diversas acciones sobre el metabolismo de los principios inmediatos. En estas circunstancias, el modo de paliar el daño oxidativo que se puede causar sobre las diferentes biomoléculas sería incrementar la capacidad antioxidante del organismo. Existen diferentes modos para obtener este fin, basándose uno de ellos en la administración de antioxidantes como suplementos dietéticos (Carlsen et al., 2010).

1.3.2 Daño oxidativo a biomoléculas

Aunque los RLs pueden oxidar cualquier tipo de biomolécula, los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas son sus principales dianas (Young, 2001).

1.3.2.1 Daño oxidativo a lípidos

La oxidación **lipídica o peroxidación** consiste en el deterioro oxidativo de grasas oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos poliinsaturados. Generalmente ocurre cuando el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) es generado en la proximidad de las membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico o el docohexanoico.

Un $\bullet\text{OH}$ puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados, que son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez iniciar nuevas cadenas de peroxidación. Es precisamente en la propagación del daño oxidativo donde radica la mayor importancia de los RLs (Figura 5).

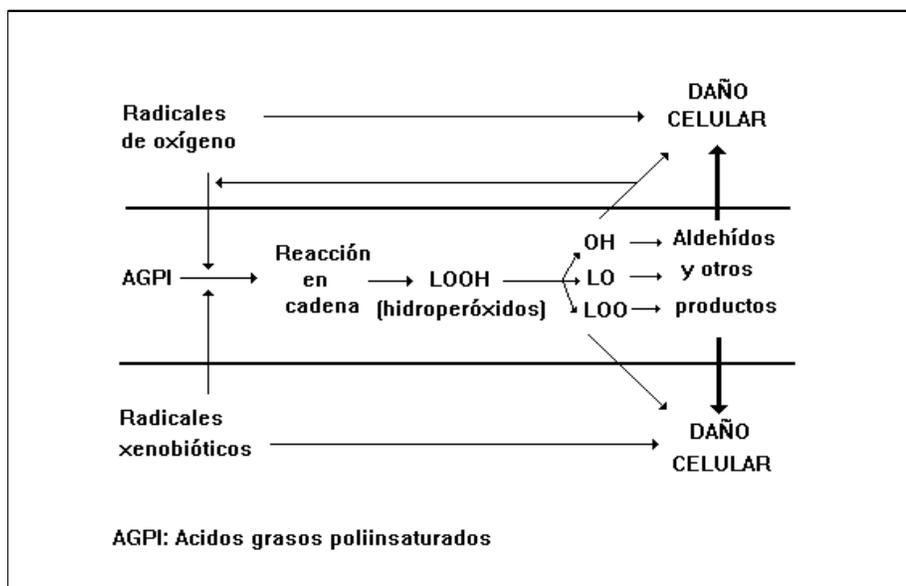


Figura 5. Esquema de los mecanismos implicados en la lipoperoxidación (Janero, 1990).

1.3.2.1.1 Productos de la peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos produce una pérdida de fluidez en las membranas e incluso la muerte celular, pero también puede inducir la formación de intermediarios derivados de los lípidos.

Entre los diferentes aldehídos que se producen en la peroxidación de lípidos, los más intensamente estudiados han sido el malondialdehído (MDA) y los 4-hidroxiálquenos, en particular el 4-hidroxi-nonenal y el 4-hidroxi-hexenal (Esterbauer et al., 1991).

a) *Malondialdehído* (MDA)

El MDA es una molécula volátil, de bajo peso molecular (PM = 72,07), con un grupo 1,3- dicarbonilo siendo moderadamente ácido (Figura 6). En solución y en fase gaseosa, el MDA está enteramente enolizado manteniéndose a través de un enlace de hidrógeno intramolecular un equilibrio entre dos formas asimétricas.

Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del ácido araquidónico y el ácido docosahexanoico. Han sido varias las rutas hipotetizadas para esta formación (Pryor & Stanley, 1975; Wilson, 1979), pero todas implican una primera ciclación del ácido graso poliinsaturado originario, que tras sucesivos intermediarios, se rompe para formar, entre otros productos de degradación, el MDA. Dado que este compuesto es un producto final común de la peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido aceptada ampliamente como marcador de este proceso (Halliwell, 2000).

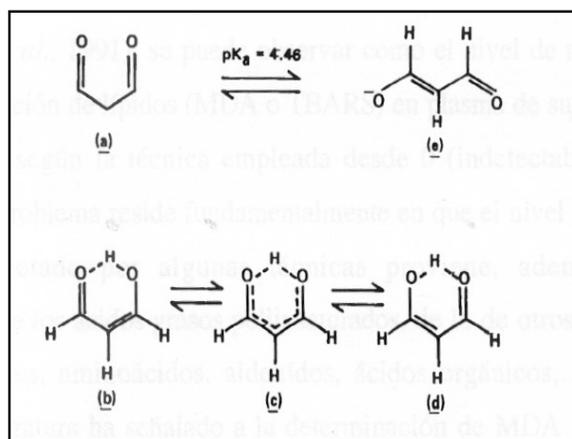


Figura 6. Estructura química del MDA (Janero, 1990).

Desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han sido implicadas causalmente en la patogénesis de algunas enfermedades humanas, la determinación de productos remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, en tejidos o fluidos humanos, ha recibido considerable atención. Hasta ahora se han utilizado mayoritariamente técnicas que se basan en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico. Sin embargo, en la determinación de este producto hay que tener en cuenta la técnica empleada. En un estudio de Esterbauer (Esterbauer et al., 1991) se puede observar como el nivel de remanentes de la peroxidación de lípidos en plasma de sujetos sanos puede variar según la técnica empleada desde 0 (indetectable) a 47,2 nmol/mL. El problema estriba en que el nivel detectado por algunas técnicas proviene, además de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, de la degradación de otros productos (como azúcares, aminoácidos, aldehídos, ácidos orgánicos...) (Janero, 1990).

1.3.2.2 Daño oxidativo a proteínas

Los radicales libres son capaces de oxidar a todos los aminoácidos presentes en las proteínas ya que tienen residuos susceptibles, sobre todo a nivel de grupos carbonilo, pudiéndose formar uniones proteína-proteína o fragmentar el esqueleto

de la proteína (Cheal et al., 2009). Por tanto, dicha oxidación produce un cambio conformacional de la proteína y, en consecuencia, una modificación o pérdida de función biológica. Que una proteína sea susceptible al ataque de los radicales libres va a depender tanto de su composición de aminoácidos como de la accesibilidad a estos aminoácidos de la especie oxidante. Debe destacarse, en este sentido, que la metionina y la cisteína son especialmente sensibles a la oxidación por casi todas las formas de ROS (Stadtman & Levine, 2003).

Ciertamente, existen numerosos ejemplos de ello. Entre las oxidaciones que son de tipo reversible, se encuentra la oxidación de metionina a metionina sulfóxido y su reducción enzimática de nuevo a metionina. Y entre oxidaciones de tipo irreversible se da en la histidina y el triptófano cuando el daño provoca la ruptura del anillo imidazólico de dichos aminoácidos. Un ejemplo de la importancia de la oxidación de proteínas lo representan las lipoproteínas de baja densidad (LDL), donde histidinas y lisinas son susceptibles de ser modificadas por oxidación, lo que causa una alteración en el reconocimiento del receptor correspondiente (Griffiths et al., 2002; Obama et al., 2007).

Por otra parte, los grupos carbonilo también pueden ser introducidos en las proteínas por reacciones con aldehídos que se producen durante la peroxidación lipídica, o con derivados carbonilo reactivos generados durante la reacción de reducción de azúcares o de sus productos de oxidación con los residuos de lisina, con la eventual formación de productos avanzados de glicoxilación (Miyata et al., 1998; Yuan et al., 2007).

1.3.2.3 Daño oxidativo a glúcidos

Los monosacáridos y los disacáridos resisten a la acción de las especies oxigénicas reactivas. La glucosa es capaz de captar al radical superóxido impidiendo su acción sobre otras moléculas. La manosa y el manitol son captadores del radical

hidroxilo (Shen et al., 1997). Por tanto, se ha considerado a algunos polisacáridos como agentes protectores celulares (Albertini et al., 1996).

Por consiguiente, el daño oxidativo sobre los glúcidos adquiere importancia cuando se trata de polisacáridos con función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por los radicales libres (Duan & Kasper, 2011), alterando sus funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleuquinas (IL) y la formación de prostaglandinas (PGE), hormonas y neurotransmisores.

1.3.2.4 Daño oxidativo al ADN

El ADN también es susceptible al ataque de los radicales libres (Figura 7). Conocido es que el oxígeno es capaz de adicionarse a las bases o al azúcar del ADN formándose el radical peroxilo. Las sucesivas reacciones sobre el ADN dan lugar a la modificación de sus bases y a la formación de puentes cruzados proteínas-ADN. Cabe destacar que el daño oxidativo al ADN por los radicales libres se puede dar mediante dos reacciones principalmente:

- La reacción con los residuos desoxirribosa: donde el radical libre ataca a una desoxirribosa del ADN, produciéndose de manera general una rotura de la cadena en el lugar de la reacción. Pero, la cadena complementaria que permanece intacta puede mantener unidos los dos extremos de la cadena dañada hasta que actúen las enzimas reparadoras. Por lo que no se trata de un daño crítico a no ser que haya una rotura cercana en las dos cadenas (Breen & Murphy, 1995).

- La reacción de adición de los radicales a las bases del ADN: esta reacción es más frecuente que la rotura de las cadenas y da lugar a un gran número de productos. El modo de reacción principal consiste en la adición, a nivel de los carbonos C-4 y C-8, de las purinas y, a nivel de los carbonos C-5 y C-6, de las pirimidinas, produciendo un conjunto de formas radicales de las bases, que

sufren modificaciones hasta la obtención productos finales muy modificados (Breen and Murphy, 1995).

Entre las principales bases modificadas cabe destacar: 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina, 8-oxoadenina, 8-oxoguanina, 5-hidroxicitosina, timina glicol, 4,6-diamino-5-formamidopirimidina, 5-hidroxi-5-metilhidantoina, entre otras, produciendo mutagénesis y carcinogénesis (Griffiths et al., 1988; Kryston, 2011).

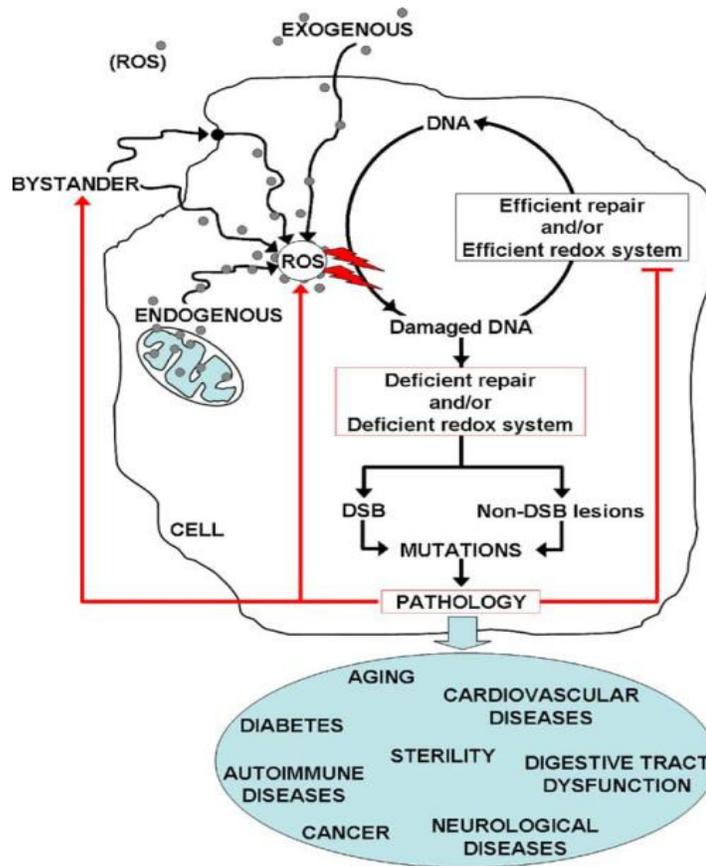


Figura 7. Daño oxidativo al ADN y mecanismos de destrucción celular, tomada de Sedelnikova et al., 2010.

Es importante mencionar que el ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el ADN nuclear (Richter et al., 1988). Las causas de ello son, en primer lugar, que su genoma presenta una serie de características determinadas, tales como escasez de enzimas reparadoras, ausencia de histonas que protejan al ADN y

su proximidad a la cadena de transporte mitocondrial (uno de los principales sistemas de producción de especies oxigénicas reactivas). Y, en segundo lugar, que no posee intrones, de modo que la modificación de cualquier base afecta normalmente a una zona codificante del ADN, siendo sus consecuencias más importantes. Por tanto, las lesiones en el ADN mitocondrial se acumulan con la edad en una tasa más elevada que el ADN nuclear (Ames et al., 1993; Lee & Wei, 2012).

1.4 ANTIOXIDANTES

1.4.1 Concepto de antioxidante

Un **antioxidante** se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell & Gutteridge, 1989). El término “sustrato oxidable” incluye casi todo lo que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. Sin embargo, esta definición original fue simplificada posteriormente para ajustarla al conocimiento como: *“cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo sufrido por una molécula diana”* (Halliwell, 2007).

Un organismo aerobio sano mantiene una producción de radicales libres equilibrada con su defensa antioxidante, aunque este equilibrio no es perfecto y continuamente ocurre algún grado de daño oxidativo. Esto ocurre, según algunos autores, porque energéticamente es más eficiente reparar los daños que evitar al máximo la oxidación (Halliwell, 2012), pero posiblemente también porque en algunas ocasiones se producen radicales libres cuya producción y diseminación es prácticamente imposible de interceptar (por ejemplo en la producción del OH• tras la acción de radiaciones ionizantes) (Pomposiello, 2002; Nathan, 2003; Cho, 2004; Temple, 2005; Rhee, 2005; Von Sontang, 2006).

Como hemos visto en el párrafo anterior, el organismo utiliza las especies reactivas en la medida necesaria, repara los daños que se producen y trata de controlar su proliferación desordenada, con el objetivo de mantener un equilibrio u

homeostasis REDOX: el equilibrio entre la producción y la desactivación. Los mecanismos empleados para mantener este equilibrio reciben en conjunto el nombre de “sistema antioxidante”. Se entiende por **sistema antioxidante** el conjunto de compuestos moleculares, sistemas enzimáticos y compuestos antioxidantes y pro-antioxidantes que controlan el equilibrio REDOX a nivel celular, retrasando, previniendo o eliminando el daño oxidativo causado a una molécula diana (Halliwell, 2007). Se trata de un complejo entramado defensivo cuyos componentes actúan de forma interrelacionada incluso reponiéndose unos a otros. El déficit de uno de ellos puede afectar la eficiencia de otros y el exceso relativo de alguno puede alterar las propiedades de los demás, siendo posible incluso que dependiendo de la concentración relativa alguno de ellos, adquiera propiedades prooxidantes en determinadas circunstancias.

Aunque la investigación sobre el equilibrio REDOX (cómo mantenerlo y cómo prevenir su alteración) ha logrado muchas respuestas, desde las primeras definiciones de Halliwell, siguen existiendo grandes incógnitas, que precisan ser despejadas, como por ejemplo, sobre el aporte idóneo de antioxidantes o las posibilidades terapéuticas ante situaciones de estrés oxidativo (Shah, 2009; Alfadda, 2010; Carlsen, 2010; Tsai, 2010).

1.4.2 Clasificación de antioxidantes

1.4.2.1 Tipos de antioxidantes desde un punto de vista fisiológico

Desde un **punto de vista de fisiológico**, los antioxidantes se pueden clasificar en:

a) **Antioxidantes primarios**, que son los que previenen la formación de nuevos radicales libres, detoxificándolos y de este modo, convirtiéndolos en moléculas menos dañinas, o bien impidiendo su formación. Dentro de este grupo se incluyen a la catalasa, la glutatión peroxidasa, la superóxido dismutasa y las proteínas ligadoras de metales (ferritina y ceruloplasmina).

b) **Antioxidantes secundarios**, que son protectores no enzimáticos que intervienen cuando existe una superproducción de radicales libres y los sistemas enzimáticos están desbordados, previniendo así las reacciones en cadena. Dentro de este grupo se incluyen el glutatión, la vitamina E, la vitamina C, el ácido úrico, la bilirrubina y la albúmina (Finaud et al., 2006).

c) **Antioxidantes terciarios**, que son los encargados de la reparación de las biomoléculas dañadas por los radicales libres, para impedir su acumulación indeseada. Entre ellos se encuentran los sistemas proteolíticos y lipolíticos, así como los mecanismos enzimáticos de reparación del ADN. En estos sistemas están incluidos los siguientes subsistemas:

➤ *Sistema reparador directo*: un grupo de enzimas reparadoras como las proteasas y las fosfolipasas, que actúan sobre proteínas y fosfolípidos, una vez se produce el daño en la molécula y éstas deben ser reemplazadas vía síntesis *de novo* (Davies, 1995; Sartor & Jiricny, 2003). Otro grupo de enzimas actúan mediante la reducción de los grupos (S-S) de los aminoácidos azufrados de las proteínas, como son la disulfuro reductasa y la sulfóxido reductasa.

➤ *Sistema reparador indirecto*: este sistema conlleva, en primer lugar, el reconocimiento del daño molecular (siendo este eliminado o degradado) y, en segundo lugar, la síntesis de la parte eliminada. Esto puede ocurrir tanto en proteínas oxidadas y en peróxidos lipídicos de las cadenas carbonadas, como en oxidaciones de ADN y ARN (Mataix, 2002). En el caso de la reparación del ADN, se identifica en primer lugar el sitio dañado sobre el ADN y entonces se inicia el proceso de reparación de varias maneras, dependiendo de la estructura de la lesión y su impacto en el ADN. Por ejemplo, las lesiones voluminosas son reparadas por las proteínas NER (reparación de escisión del nucleótido), mientras que las lesiones más simples de ADN se reparan por las proteínas BER (reparación de escisión de base). A diferencia de las proteínas NER y BER, las proteínas BR (inversión de base) reparan, por inversión

completa de las bases dañadas, las lesiones producidas por alquilación (Jena, 2012).

1.4.2.2 Tipos de antioxidantes desde un punto de vista bioquímico

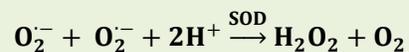
Desde un **punto de vista bioquímico**, los antioxidantes se pueden clasificar en antioxidantes enzimáticos y antioxidantes no enzimáticos.

1.4.2.2.1 Antioxidantes enzimáticos

Las principales enzimas antioxidantes celulares que forman parte de los sistemas de defensa son la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx).

a) Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa (EC.1.15.1.1.) cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, el cual puede ser reducido, de nuevo, por la catalasa o por la glutatión peroxidasa (McCord & Fridovich, 1969; Fridovich, 1974):



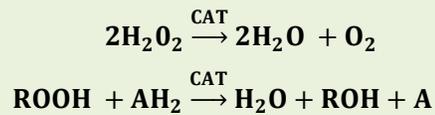
Es importante destacar que aproximadamente del 1 al 2% del oxígeno que se consume por la mitocondria en estado respiratorio 4, se transforma en la cadena de transporte electrónico en radical superóxido, el cual es detoxificado por esta enzima, la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn). Otra función de la

superóxido dismutasa consiste en proteger a las deshidratasas frente a la inactivación por el radical superóxido.

Existen diferentes formas de esta enzima antioxidante, según el grupo prostético ligado a ella. Así, en eucariotas se han definido las siguientes: la manganeso SOD (Mn-SOD) en la matriz mitocondrial y el citosol; la extracelular SOD (EC-SOD) y cobre/zinc SOD (CuZn-SOD) que se localiza en el citosol (Zelko et al., 2002).

b) *Catalasa*

La catalasa (EC 1.11.1.6.) participa en la detoxificación del peróxido de hidrógeno para dar lugar a agua y a una molécula de oxígeno (Chance et al., 1979). También es capaz de catalizar reacciones de peroxidación en presencia de peróxido de hidrógeno, actuando sobre algunos alcoholes, aldehídos o ácidos orgánicos como sustratos, protegiendo a las células del peróxido de hidrógeno interno:

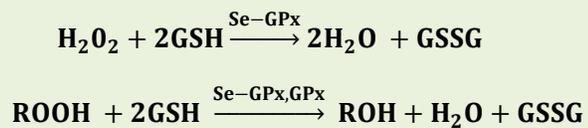


La catalasa es una enzima tetramérica con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa que contienen un grupo de ferriprotoporfirina por subunidad, alcanzando una masa molecular de 240 kDa. Requiriendo para su actividad que el Fe^{3+} se una al sitio activo de la enzima. La catalasa es abundante en células de mamíferos y se localiza principalmente en los peroxisomas (Tolbert & Essner, 1981), donde destruye el peróxido de hidrógeno generado por las oxidasas localizadas dentro de estos orgánulos (Halliwell, 1996).

c) *Glutación peroxidasa (GPx)*

La glutación peroxidasa es fundamental en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y los peróxidos lipídicos que se generan en las células (Chance et al., 1979), por lo que es muy importante para el mantenimiento de la estructura y la función de las membranas biológicas (McCord, 2000). Aparece en los organismos superiores, con el fin de reemplazar la necesidad de la catalasa. La glutación peroxidasa (GPx) cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y los hidroperóxidos orgánicos hasta agua y alcohol, respectivamente, utilizando como donador de electrones, al glutación reducido. Existen dos tipos de glutación peroxidasa, una independiente del selenio (GPx, EC 2.5.1.18) (Sheehan et al., 2001) y otra que es selenio dependiente (Se-GPx, EC 1.11.1.9). En humanos se han identificado ocho isoformas diferentes de GPx: GPx1, GPx2, GPx3, GPx4, GPx5, GPx6, GPx7, y GPx8 (Brigelius-Flohé, 2006; Styskal et al., 2012).

Ambas requieren glutación reducido (GSH) para catalizar la siguiente reacción:



La mayor parte de la actividad glutación peroxidasa se encuentra en el citosol, aunque también está presente en la matriz mitocondrial (Ketterer, 1986).

Hay otras enzimas importantes que también participan en el sistema de defensa, incluidas en las reacciones de la regeneración del glutación, como son la glutación reductasa o la NADPH-quinona oxidoreductasa (DT-diaforasa). Ésta última cataliza la reducción de quinona a quinol y participa en la reducción de drogas de estructura quinónica (Davies, 1995).

1.4.2.2.2. Antioxidantes no enzimáticos o “scavengers” de radicales libres

El sistema de defensa antioxidante no enzimático presenta una gran diversidad de moléculas antioxidantes. Por una parte, las lipofílicas, tales como el β -caroteno, la ferritina, la ceruloplasmina, el selenio, el manganeso, la ubiquinona, el zinc o el ácido úrico. Y, de otra parte, las hidrofílicas, destacando el glutatión, la vitamina C, la vitamina E o los flavonoides, entre otras. Los principales antioxidantes no enzimáticos son:

a) *Glutatión (GSH)*

El glutatión fue descubierto por Hopkins en 1921 y se trata de un tripéptido compuesto de ácido glutámico, cisteína y glicina. Se sintetiza principalmente en el hígado y es transportado por la circulación sanguínea hasta los tejidos. Se considera la molécula antioxidante endógena más importante.

Su estructura química (Figura 8) le confiere muchas posibilidades para desempeñar sus funciones fisiológicas, ya que el grupo tiol (-SH) de la cisteína le proporciona capacidad para intervenir en reacciones redox, mediante el intercambio de electrones a través del azufre de la cisteína y por otro lado, el enlace γ -glutamilo le confiere resistencia frente a la degradación por las peptidasas (Meister y Anderson, 1983).

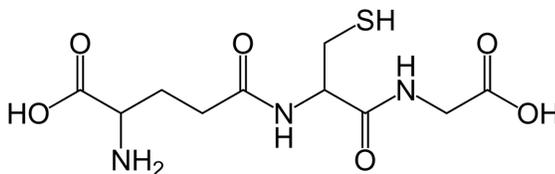


Figura 8. Estructura química del glutatión.

Se denomina sistema glutatión al conjunto formado por el glutatión y los enzimas relacionados con su metabolismo, que son además responsables del

mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister & Anderson, 1983).

El glutatión se puede encontrar en dos formas: como glutatión reducido o GSH, o bien como glutatión oxidado o GSSG al estar compuesto por dos moléculas de GSH unidas por un puente disulfuro entre las cisteínas. Principalmente, se encuentra en las células en su forma reducida, y gran parte de sus funciones se deben a la presencia del grupo tiólico reducido que le confiere la cisteína. Su distribución es universal al estar presente tanto en plantas como en animales y juega un papel importante en la protección celular contra los efectos tóxicos de los radicales libres, así como frente a los efectos nocivos de las radiaciones.

La síntesis del GSH (Figura 9) se produce en dos etapas donde intervienen dos enzimas. En la primera etapa se da lugar a la γ -glutamilcisteína a partir del ácido glutámico y la cisteína, mediante la reacción catalizada por la γ -glutamilcisteína sintetasa. El paso limitante de la síntesis del GSH es la disponibilidad de la cisteína. En la segunda etapa, la glutatión sintetasa cataliza la reacción donde la γ -glutamilcisteína se une con la glicina para formar el tripéptido. La síntesis del GSH se encuentra regulada por retroalimentación, ya que el GSH inhibe la γ -glutamilcisteína sintetasa. (Griffith, 1999).

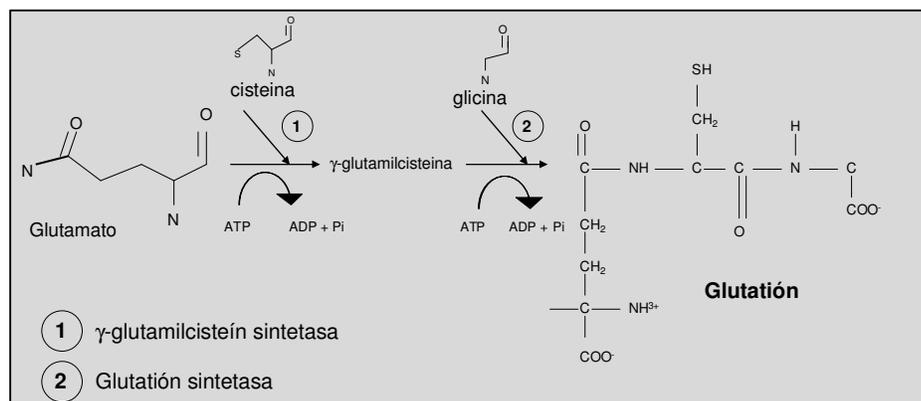


Figura 9. Síntesis de GSH

Además de participar en diversos procesos fisiológicos, tales como la detoxificación de xenobióticos o la síntesis de ADN de un modo indirecto a través de proteínas tiólicas (glutarredoxina y tiorredoxina) que dependen del GSH, éste último se caracteriza por su papel antioxidante ya que es capaz de interactuar con los radicales libres y estabilizar radicales como el hidroxilo, el superóxido y los peróxidos, lo puede hacer reaccionando directamente con los radicales libres, o bien por medio de la glutatión peroxidasa para reducir los peróxidos formados (Wefers & Sies, 1983; Sies, 1999, Masella et al., 2005).

La glutatión peroxidasa es la enzima clave del ciclo redox del glutatión (Figura 10): cuando se produce una agresión oxidativa, el GSH se oxida a glutatión oxidado (GSSG) mediante la reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado se reduce inmediatamente a GSH por medio de la glutatión reductasa, la cual es dependiente de NADPH, que será suministrado por la glucosa-6-fosfatodeshidrogenasa. De esta manera, el glutatión es un factor esencial para la glutatión peroxidasa, por lo que su disminución puede deteriorar la acción de la enzima, con el consiguiente freno a los mecanismos limitadores de la peroxidación lipídica (Ameen et al., 2004; Sahin & Gumuslu, 2004; Sener et al., 2005).

Para algunos autores como Waly, el equilibrio entre GSH y GSSG, es el principal determinante del estado oxidativo del organismo humano (Waly et al., 2012).

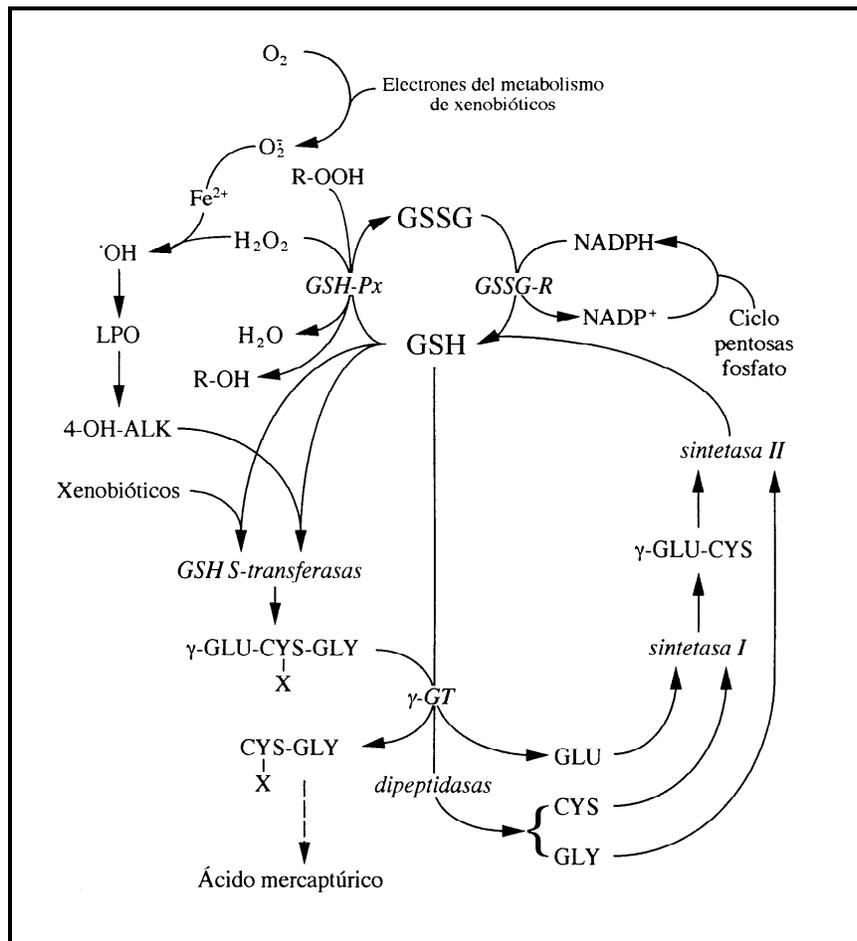


Figura 10. Representación del sistema glutatión.

b) *Vitamina E*

Este término es una descripción genérica para una familia de compuestos fenólicos llamados tocoferoles y tocotrienoles. Se acumula en las membranas biológicas y en las lipoproteínas plasmáticas, puesto que se caracteriza por ser altamente lipofílico. Se considera el antioxidante natural más potente, capaz de bloquear la cadena de lipoperoxidación en la membrana celular.

La vitamina E se compone mayoritariamente de α - γ -tocoferol, estando las formas ingeridas en estado libre o formando ésteres (Figura 11). La principal fuente

de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, soja) y productos elaborados a partir de estos aceites (margarinas, mayonesas, repostería). También se encuentra presente en frutos secos como las almendras, nueces y las avellanas. Otros alimentos como legumbres, lácteos y cereales pueden contribuir significativamente a la ingesta total de la vitamina E.

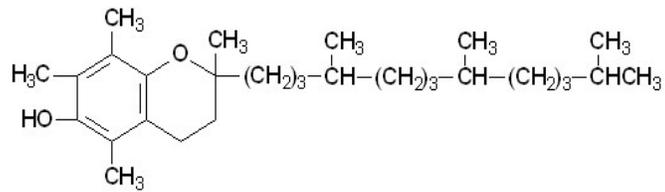


Figura 11. Estructura química del α -tocoferol.

La vitamina E puede reaccionar con $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^{\bullet} y ROO^{\bullet} . Una de sus funciones más importantes es la inhibición de la peroxidación lipídica, actuando de “scavenger” del radical peroxilo y dando como producto hidroperóxidos y radical tocoperoxilo, el cual puede transformarse en quinona en presencia de O_2 . Si bien la cantidad de quinona que se forma es mínima y ésta se elimina por orina o bilis (Figura 12). Lo que suele ocurrir es que la forma oxidada se reduce nuevamente en presencia de ácido ascórbico, de ubiquinol (QH_2) o de GSH, pudiendo actuar nuevamente de antioxidante (Figura 13) (Brigelius-Flohé & Traber, 1999; Abudu et al., 2004).

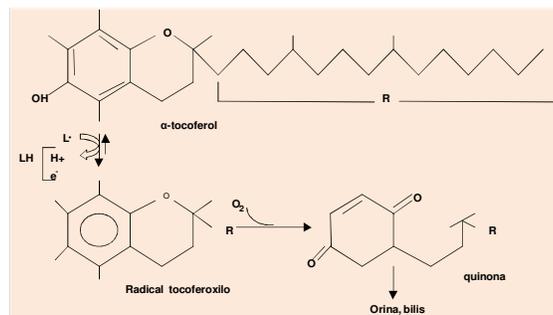


Figura 12. Reacción del α -tocoferol con los peróxidos.

Por tanto, la generación de la vitamina E va a depender de las condiciones existentes: se consume en primer lugar el ácido ascórbico cuando los radicales se forman en fase acuosa, mientras que se consume primero el coenzima Q cuando los radicales se forman en la membrana. La vitamina E también puede actuar de prooxidante, produciendo peroxidación en las LDL, facilitando la transferencia de la reacción de los radicales de la fase acuosa al interior del ambiente lipídico. Para inactivar esa peroxidación mediada por el tocoferol, son necesarios unos adecuados agentes reductores, llamados coantioxidantes, siendo los más eficaces el ácido ascórbico en ambientes hidrofílicos y el coenzima Q en ambientes hidrofóbicos (Figura 13) (Kontush et al., 1996).

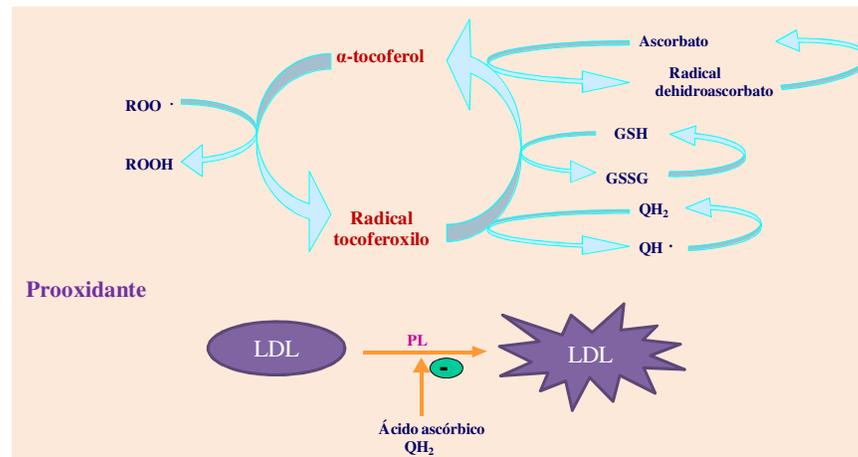


Figura 13. Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina E. Valls-Bellés, 2001

c) *Vitamina C*

La vitamina C o ácido ascórbico (Figura 14) es una vitamina hidrosoluble. Las plantas y la mayoría de los animales pueden sintetizarla a partir de la glucosa, sin embargo los humanos, otros primates superiores y las cobayas no poseen la última enzima para su biosíntesis, la L-gluco-γ-lactona oxidasa, que tiene que ser incorporada con la dieta.

Además, como la mayoría de las vitaminas hidrosolubles, no se almacena en el cuerpo por un largo período de tiempo y se elimina en pequeñas cantidades a través

de la orina, de ahí la importancia de su administración diaria para evitar que se agoten sus reservas. La vitamina C muestra una amplia distribución en los tejidos, y es máxima su concentración en aquellos con un intenso metabolismo como son las glándulas suprarrenales, la hipófisis, el hígado, el páncreas, el encéfalo y los ojos (Rumsey & Levine, 1998).

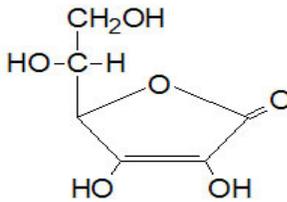


Figura 14. Estructura química del ácido ascórbico.

La vitamina C se absorbe mayoritariamente en el duodeno y en el yeyuno proximal mediante un mecanismo de transporte activo dependiente del sodio. Las principales fuentes son las frutas, especialmente los cítricos, el kiwi, las fresas, el melón y los arándanos. También se encuentra en determinadas verduras y hortalizas como tomate, pimiento, espinacas, coles de Bruselas, coliflor, repollo y brócoli. Y, entre los alimentos de origen animal, aun teniendo siempre una importancia minoritaria, cabe destacar únicamente el hígado (Mataix, 2002).

La vitamina C es uno de los antioxidantes más potentes en fase acuosa, que actúa a nivel extracelular y citosólico. Presenta unas características estructurales que le permite reaccionar con las especies oxigénicas reactivas, tales como: $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , ROO^{\bullet} , OH^{\bullet} y 1O_2 oxidándose a dehidroascorbato y siendo nuevamente reducido a ácido ascórbico por acción de la dehidroascorbato reductasa (Ashton et al., 1999; Dhremer et al., 2001) (Figura 15). Esta reducción puede ocurrir por vía no enzimática por la glutatión o por vía enzimática por la actuación de proteínas que muestran actividad dehidroascorbato reductasa incluyendo la tioltransferasa. El glutatión es necesario para la reducción del DHA, y se obtiene probablemente de la reacción

catalizada por la glutatión reductasa requiriendo NADPH como cofactor (Figura 15). Por otro lado, la vitamina C desempeñaría otro papel como antioxidante, regenerando la vitamina E, donde se consume la forma nativa de la vitamina C. La vitamina C en presencia de metales de transición como Fe^{2+} o Cu^{2+} posee actividad prooxidante, que puede tener efectos importantes *in vivo* dependiendo de la disponibilidad de los iones metálicos (Figura 15) (Young & Woodside, 2001; Du et al., 2012).

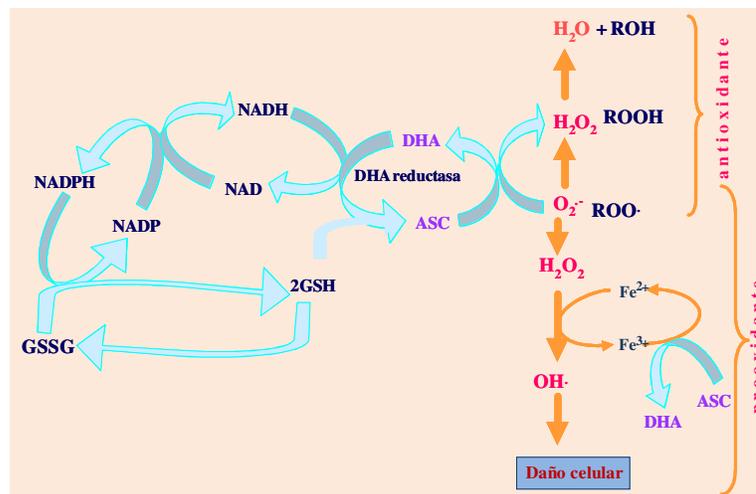


Figura 15. Esquema de la actividad antioxidante y prooxidante de la vitamina C. Valls-Bellés, 2001.

d) Polifenoles

Estos compuestos se agrupan según su estructura química en dos grandes grupos: no flavonoides y flavonoides.

Los **no flavonoides**, abarcan los ácidos fenólicos, divididos en ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos, portadores de una cadena lateral insaturada (C6-C3), pero también a otros derivados fenólicos como los estilbenos.

Los **flavonoides** son derivados benzo- γ -piranos, caracterizados por un esqueleto base de 15 átomos de carbono (C6-C3-C6) de tipo 2-fenil-benzopirona, es decir, están formados por dos anillos bencénicos unidos por una cadena de 3 carbonos, que se cierra en heterociclo oxigenado compuesto de 6 eslabones. Estos compuestos están divididos en varias subclases que se distinguen por el grado de oxidación de su núcleo pirano (Figura 16) (Bravo, 1998).

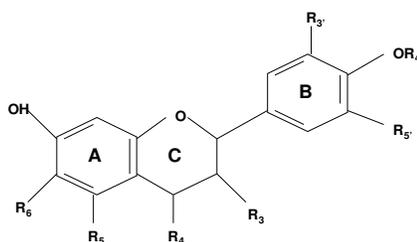


Figura 16. Estructura química básica de los flavonoides.

Hoy en día ya se conocen más de 5.000 flavonoides diferentes; pueden destacarse entre las familias más importantes las siguientes (Beecher, 2003): flavonoles, flavonas, flavanonas, flavanoles, isoflavonas y procianidinas. Se caracterizan por presentar un gran variabilidad estructural, ya que pueden aparecer desde simples moléculas fenólicas hasta compuestos muy polimerizados con pesos moleculares superiores a los 30.000 Da (Bravo, 1998). Los flavonoides comprenden un grupo de compuestos polifenólicos ampliamente distribuidos en la mayoría de alimentos de origen vegetal, especialmente en las frutas (uvas, fresas, granadas y arándanos), en las verduras como cebollas, puerros, brócoli y tomates cherry, así como en el té, la cerveza y el vino tinto (Valls-Bellés et al., 2005).

Actualmente, se carece de estudios concluyentes con respecto a absorción, metabolismo y secreción de los flavonoides. En los alimentos, la mayoría de los flavonoides excepto flavanoles se encuentran en forma glicosilada, siendo con mayor frecuencia los azúcares ligados la glucosa o la ramnosa (Harborne, 1994). Estos compuestos son resistentes a los ácidos del estómago y pasan intactos al intestino. Y en el intestino delgado solamente se absorben las agliconas y algunos glicósidos mientras que el resto son hidrolizados por la microflora del colon (Pietta,

1998; Scalbert & Williamson, 2000). Tras su absorción son conjugados en el hígado y participan en la circulación enterohepática lo que puede aumentar su tiempo disponible en plasma (Manach et al., 2004). Los que mejor absorbe el intestino humano son las isoflavonas y el ácido gálico, seguido por catequinas, flavononas y quercetinas (Manach et al., 2005).

Los polifenoles parecen ser más eficaces para inhibir la oxidación del colesterol LDL y las lipoproteínas transportadoras del colesterol LDL que el ácido ascórbico, el alfa tocoferol o el betacaroteno, según los estudios de Vinson (Vinson et al., 1999). Se ha descrito para los polifenoles presentes en la dieta acciones tan importantes como la prevención de la rotura de la doble hélice del ADN o de la toxicidad por la quelación de metales (García-Alonso et al., 2007), el secuestro de radicales libres por inhibir la acción de los ROS (Aboul-Enein et al., 2007) y la reducción de la acción del radical tocoferoxilo (Pazos et al., 2007). Además se han descrito acciones antitumorales, antiinflamatorias y preventivas de tumores (Shoeb et al., 2007; Busch C et al., 2015).

De hecho, la estructura química de los flavonoides es precisamente la que les confiere su capacidad para actuar como captadores de radicales libres (Heim et al., 2002). De hecho, existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides (Figura 17) resulta de una combinación de sus propiedades secuestradoras de radicales libres y quelantes de hierro y cobre, impidiendo la formación del radical hidroxilo (Bohm et al., 1998; Bravo, 1998; Russo et al., 2000; Middleton et al., 2000; Mira et al., 2002; Ozgova et al., 2003).

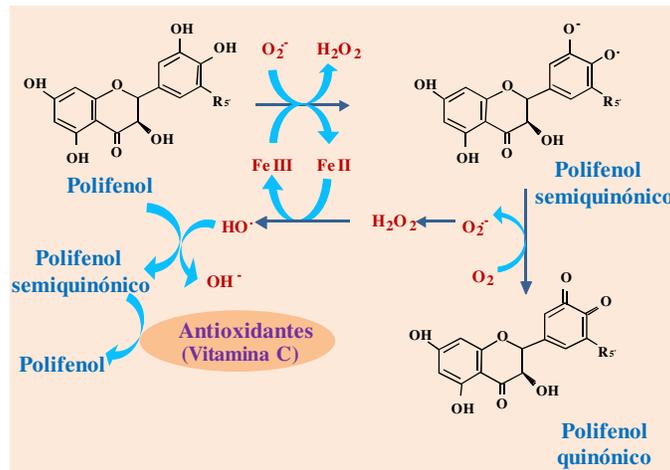


Figura 17. Actuación de los polifenoles como "scavenger" de los radicales libres.
Valls-Bellés, 2001

Por otro lado, diversos estudios ponen de manifiesto que presenta mayor poder antioxidante la combinación de polifenoles que los mismos aislados. Los polifenoles aislados, como el galato de epigallocatequina, la quercetina, la diosmetina y el pignogenol, ejercen una protección parcial ante la peroxidación lipídica inducida en la retina bovina y porcina, mientras que la combinación de todos ellos aumenta muchísimo el efecto protector (Valls-Belles et al., 2004).

e) *Carotenoides*

La vitamina A la obtenemos a través de la dieta en forma lipófila (retinol) e hidrófila (carotenoides):

- El derivado lipófilico (retinol) lo contienen alimentos como el hígado de animales, las carnes, la yema de huevo, la leche y sus derivados con contenido graso.
- Carotenoides: son los pigmentos responsables del color amarillo, naranja o rojo de frutas y verduras y los encontramos en tomates, calabazas, mangos, zanahorias o espinacas.

Los carotenoides son hidrocarburos poliénicos sintetizados por las plantas a partir de ocho unidades de isopreno. Se conocen unos 600 carotenoides aislados, de los cuales unos 50 son precursores de la vitamina A o retinol, siendo el más activo, y cuantitativamente más importante, el β -caroteno.

Los carotenoides se pueden clasificar en dos grandes grupos, los carotenoides hidrocarbonados o **carotenos** y los oxicarotenoides o **xantofilas**. Los carotenos son carotenoides que no contienen oxígeno, como los α o β -carotenos o el licopeno, mientras que las xantofilas, como la criptoxantina, cantaxantina y la luteína, son carotenoides oxigenados que contienen grupos carboxilos y/o hidroxilos en sus grupos sustituyentes (Figura 18). Existen datos procedentes de estudios clínicos, experimentación con animales y cultivos celulares que demuestran el papel de la luteína en la protección de diversas enfermedades en las que el estrés oxidativo está implicado como mecanismo fisiopatológico, como es el caso de la diabetes (Muriach et al., 2006; 2008).

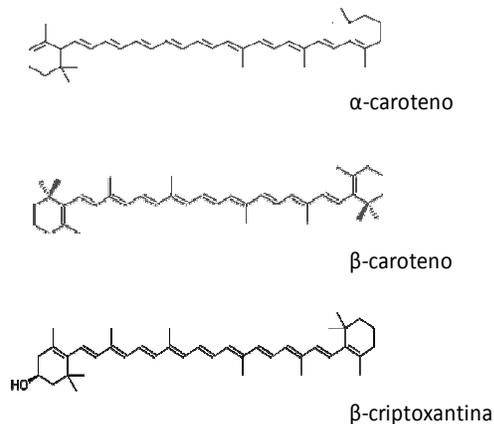


Figura 18. Estructura química de los carotenoides.

La ingesta de grasa favorece la absorción de los carotenoides de los alimentos, pero la biodisponibilidad de los diferentes carotenoides viene condicionada también por el procesado, el alimento que lo contiene y las estructuras terciaria y

cuaternaria de la molécula del carotenoide (forma física) (De Pee & West, 1996; Stahl et al., 2002).

Los carotenoides son absorbidos, mayoritariamente en el intestino delgado por difusión pasiva (Erdman, 1993; Parker, 1996), incorporados a los quilomicrones y transportados por la linfa hasta el hígado. Allí son almacenados y posteriormente distribuidos cuando son requeridos. Estos precursores de vitamina A son mayoritariamente transformados en retinol en el enterocito aunque también, en parte en el hígado y en otros tejidos. La absorción de los carotenos procedentes de la dieta, puede verse afectado por la presencia de grasa en la dieta, por otros componentes que inhiben su absorción, y por prácticas de cocinado que aumentan las pérdidas. Las infecciones parasitarias inhiben su absorción. Ante un exceso de carotenoides en la dieta, se saturan los puntos de difusión hacia el interior de los enterocitos y los enterocitos cargados de carotenos, son eliminados a la luz intestinal. La eliminación de carotenos parece hacerse fundamentalmente a través de la bilis pero no por orina (Bowen et al., 1993; Leo et al., 1995). En la bilis se excreta un 1% de la fracción plasmática diaria y esta posiblemente es reabsorbida con posterioridad (Stahl et al., 2002).

Los carotenoides presentan una pronunciada actividad antioxidante (Stahl et al., 1993; Olson & Krinsky, 1995), debida a un extendido sistema de dobles enlaces conjugados. Son eficientes antioxidantes contra el oxígeno singlete, el radical peroxilo, anión superóxido, ácido hipocloroso y otras especies reactivas. Sin embargo, esta actividad depende en gran medida de la concentración de oxígeno existente: en presencia de radicales peroxilos, el β -caroteno es un eficaz finalizador de la cadena oxidativa, siempre y cuando se mantengan las presiones parciales de O_2 bajas; en cambio, si la presión parcial no es baja, prosigue el proceso oxidativo, actuando en este caso de prooxidante. Por tanto, según cuales sean las características fisiológicas actuará de antioxidante o prooxidante (Young & Lowe, 2001) (Figura 19. Apartado a).

Además, la actividad antioxidante también depende de la estructura química de los carotenoides y el efecto acompañante de otros antioxidantes. De hecho, se ha

observado que los carotenoides con ocho o más dobles enlaces son mil veces más eficaces a la hora de reaccionar con el oxígeno singlete. En este caso, actúa mediante la transferencia de energía de excitación al β -caroteno, con posterior eliminación de dicha energía en forma de calor (Figura 19. Apartado b). Igualmente, la acción sinérgica de α -tocoferol y β -caroteno aumenta la capacidad antioxidante de este último, seguramente por protección frente a la autooxidación y también por inhibición de los posibles efectos oxidantes del radical peroxilo de β -caroteno, formado durante la acción antioxidante del mismo. Por último, habría que destacar la eficacia de los carotenos en la disminución directa de la peroxidación lipídica, así como la habilidad de estas moléculas para modular los niveles de otros antioxidantes (Böhm et al., 2012).

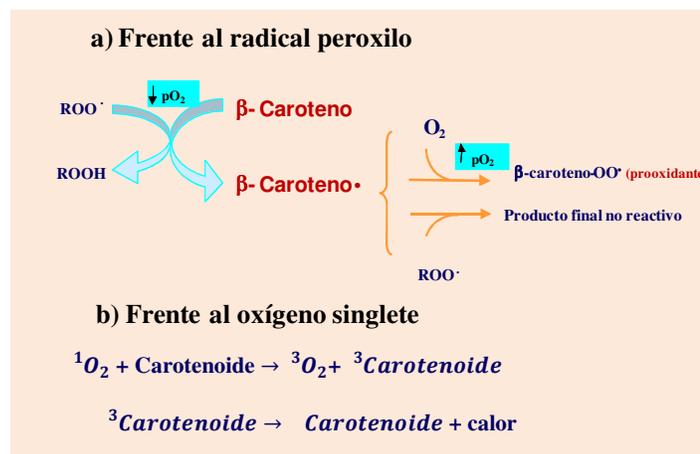


Figura 19. Mecanismos de actividad antioxidante de carotenoides.

1.4.3. Papel de la dieta en la defensa antioxidante

La dieta es muy importante para promover y mantener la buena salud a lo largo de toda la vida. Su función está bien establecida como factor determinante de enfermedades no transmisibles crónicas, convirtiéndose en un componente

fundamental en la prevención. En concreto, es la composición de la dieta la que desempeña un papel primordial en el estrés oxidativo, tanto en el daño oxidativo como en los mecanismos de defensa antioxidante. La dieta, a través de los vegetales, frutas y verduras, frutos secos y bebidas procedentes de vegetales tales como la cerveza y el vino, aporta antioxidantes como vitaminas y otros fitoquímicos, los cuales son una importante fuente exógena capaz de aumentar la respuesta celular al estrés oxidativo. Por tanto, los sistemas de defensa antioxidante, o bien dependen de la dieta o bien están directamente relacionados con esta (enzimático y reparadores), ya que dependen de otros nutrientes para su correcta funcionalidad (Valls-Bellés et al., 2005; Li, 2009) (Figura 20).

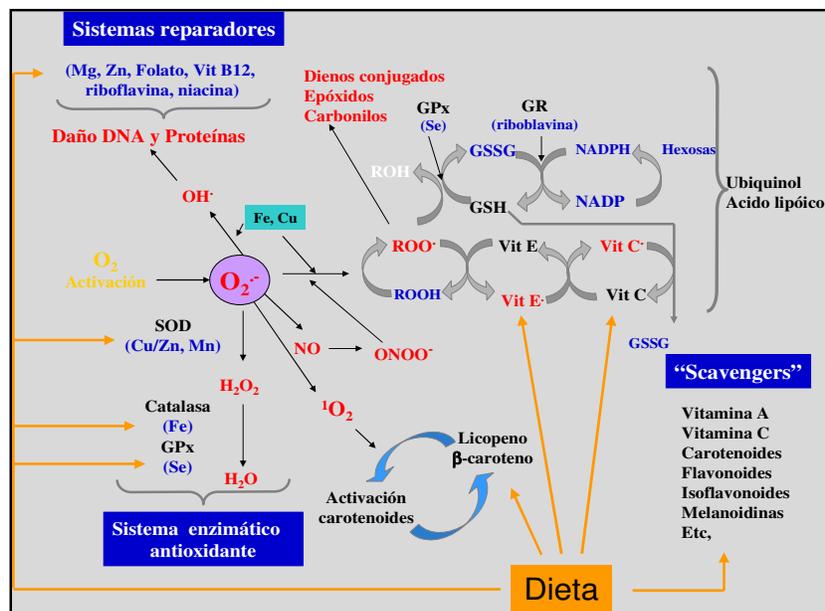


Figura 20. Esquema del metabolismo oxidativo y su relación con la dieta. Valls-Bellés, 2001

Por tanto, cada vez hay más evidencia científica de los efectos beneficiosos de una dieta variada y rica en estos alimentos con capacidad antioxidante para la prevención de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo y el envejecimiento celular (la OMS recomienda una ingesta de frutas y verduras de unos 400g/día)

(McCall, 1999; Williamson, 1999; Gardner, 2000; Van Duyn, 2000; Block, 2001; Schieber, 2001; John, 2002; Burns, 2003; Cassano, 2003; Sánchez-Moreno, 2003; Brandt, 2004; Steffen, 2005; Pan, 2008; Vioque, 2008; Ellingsen, 2009; Herrera, 2009; Nagura, 2009; Riccioni, 2009; Zhang, 2009; Epplein, 2010; Poiroux-Gonord, 2010; Yamada, 2011; Andriantsitohaina, 2012, OMS, 2004; O'Neil, 2012; Polesel, 2012; Wang, 2012; Isa, 2013). Es importante recordar, no obstante, que el aporte de antioxidantes debe ser equilibrado, como el que ofertan los alimentos, ya que cuando el aporte aislado de un solo tipo de antioxidantes (como cuando se aportan en forma de suplementos) puede conducir a situaciones de pro-oxidación que provoquen efectos contrarios a los deseados (Herrera, 2009).

2. ALIMENTACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO

2.1 ALIMENTACIÓN DURANTE LA LACTANCIA

En el momento actual, como hemos visto en el apartado anterior, se concibe como alimentación adecuada aquella que asegura no solo la ausencia de enfermedad por déficit, sino la que procura la mejor salud física y psíquica y previene enfermedades futuras. Y por ello, la dieta sana será aquella que contenga además de una cantidad determinada de macronutrientes y micronutrientes, una cierta cantidad de componentes funcionales como los antioxidantes, los compuestos prebióticos y los probióticos, entre otros (Silvestre, 2013).

La composición de la dieta materna es, pues, determinante no solo para un desarrollo y crecimiento adecuados del feto durante el embarazo (Borowczyk et al., 2006) sino también para asegurar un aporte adecuado de antioxidantes que evite el estrés oxidativo a ambos. Una dieta adecuada pre-gestación, durante el embarazo y durante el periodo puerperal y la lactancia permiten a la mujer hacer frente adecuadamente a las necesidades antioxidantes tanto en la madre como en su progenie. Cuando se produce un desequilibrio REDOX, el estrés oxidativo resultante es capaz de dañar tanto a la madre como al niño (Al-Gubory, 2010), por tanto, se recomienda incluir en la dieta de la mujer embarazada y lactante alimentos ricos en antioxidantes como la vitamina E (presente en huevo y mantequilla, aceites vegetales y legumbres), la vitamina C (abundante en cítricos, piña y determinados vegetales como el pimiento o el tomate), los carotenoides (abundantes en zanahoria, calabaza y frutas de color anaranjado o amarillento, como el mango o el kiwi amarillo) y los polifenoles (presentes en vegetales y frutas o frutos como la uva o los arándanos) (Zeisel, 2009).

En la actualidad, muchas mujeres toman dietas poco sanas, por defecto (pobres en frutas, verduras, hortalizas o legumbres) o por exceso (demasiadas calorías, grasas, sal y exceso de grasas saturadas) que ponen en riesgo su estatus

nutricional. Y esto genera déficits nutricionales que se agudizarán en etapas de mayor exigencia como la lactancia.

La **lactancia** sucede en el primer periodo de la vida y comprende varios meses durante los cuales el recién nacido se alimenta solo de leche, la cual le aporta todos los nutrientes necesarios para su normal desarrollo. La dieta y el estatus nutricional de la madre pueden afectar la salud presente y futura de sus descendientes y una deficiencia o desequilibrio nutricional en estas etapas de la vida tendrá mayor impacto ya que afectarán la salud de dos seres (Silvestre, 2013).

Los consejos nutricionales han ido variando con el tiempo, pero desde hace muchos años se reconoce que la capacidad materna para producir leche en cantidad y de calidad suficiente para las necesidades de crecimiento y desarrollo del nuevo ser, es extremadamente resistente a la privación nutricional. Prácticamente todas las madres, salvo aquellas con malnutrición extrema, son capaces de producir cantidades adecuadas de leche sin que el aporte de macronutrientes y de la mayoría de los micronutrientes, así como de las sustancias defensivas, se resienta de forma sustancial. Pero si la madre parte de una situación de reservas baja y el aporte nutritivo de la dieta durante la lactancia no es adecuado, es posible que su propio estado nutricional se resienta y que determinados contenidos de nutrientes en su leche se vean afectados, por ejemplo el iodo, el ácido docosahexaenóico, la colina y algunas vitaminas (Allen, 2005).

Hay pocos estudios sobre la ingesta dietética de las madres durante el embarazo y menos aún durante la lactancia, y las recomendaciones nutricionales para las mujeres en estas épocas se basan en extrapolaciones y en algunos pocos estudios, la mayor parte de ellos observacionales (Pcciano, 2009). Pero se sabe que durante la lactancia, el estatus nutricional materno y/o la ingesta de determinados nutrientes, como las vitaminas del grupo B (excepto el ácido fólico), la vitamina A, el selenio y el iodo, se relacionan con los niveles en leche. Algunos de ellos, por ejemplo el iodo, son nutrientes esenciales durante la primera infancia cuyas necesidades no siempre son adecuadamente cubiertas por una dieta normal, y en

algunos países existen políticas de enriquecimiento de suelos o de alimentos (sal iodada) (Pallás, 2014).

La protección del estatus oxidativo la realiza la madre aportando antioxidantes al feto a través de la sangre de cordón en la etapa intrauterina y con la leche materna al lactante, tras el nacimiento. El aporte de antioxidantes de todo tipo a través de la leche materna es importante mientras no existe otro tipo de aporte exógeno y hasta que el sistema propio alcanza un adecuado nivel de madurez. Por ello es esencial evitar en la madre una ingesta pobre o un déficit previo de antioxidantes por la influencia que ello pudiera tener en el lactante que pudiera consumir menos de la cantidad requerida para un desarrollo adecuado (Allen, 2005; Valls & Codoñer, 2011; Erdem, 2012). Los estudios en lactantes son muy escasos siendo muy probable que un estatus oxidativo deficiente de la madre pueda ser transmitido a su prole (Hoppu, 2005).

Por otra parte, durante la lactancia, el organismo materno realiza cambios adaptativos que inducen una mejor absorción y aprovechamiento nutricional, y esto disminuye la necesidad de incrementar la ingesta de nutrientes y protege en cierto modo al nuevo ser. Por ejemplo, y a pesar de haberse postulado un aumento en las necesidades de ingesta de calcio, se ha observado un mejor estatus de mineralización ósea, directamente relacionado con los meses de amamantamiento, lo que se ha atribuido a una mejor absorción y aprovechamiento del calcio a nivel intestinal durante la lactancia.

Así, la mayoría de los autores y organismos internacionales coinciden en reconocer que la lactancia es una etapa de mayor demanda de nutrientes, destinada a la producción de la leche, en la que a la hora de determinar las necesidades de ingesta hay que tener en cuenta las reservas acumuladas durante la gestación y las adaptaciones metabólicas por medio de las que el organismo materno realiza un aprovechamiento más eficiente de los nutrientes de los alimentos (Otten, 2006). Sin embargo, este es un campo en el que hay muy pocos datos debido a la escasez de investigación, especialmente en el campo de los lactantes a término.

2.2 ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA LACTANCIA

El estrés oxidativo ya se pone de manifiesto en el embarazo, tanto en el feto como en la madre, en las primeras semanas a través de la regulación de la angiogénesis de la placenta y más adelante con patologías como la preeclampsia. (Valsamakis et al., 2006; Bernardi et al., 2008 y 2012; Mutinati et al., 2014).

En el momento del parto, el paso de un ambiente intrauterino con una presión de oxígeno baja a un ambiente extrauterino aerobio con una presión de oxígeno casi cinco veces superior, hace que el recién nacido se enfrente a una elevada concentración de radicales libres (Mutinati et al., 2014). Esta incrementada producción de radicales libres debe ser controlada por el sistema de defensa antioxidante del neonato, cuyo desarrollo sucede de forma paralela al desarrollo dado durante la gestación (Bernardi et al., 2012; Díaz-Castro et al., 2014).

Con el amamantamiento la mujer contribuirá de modo significativo al mantenimiento del estado oxidativo de su hijo, con el aporte de un complejo sistema antioxidante a través de su leche (Ryan & Hay, 2016). Esto le supone necesidades extras a la mujer que debe suplir con sus reservas o con aportes *de novo* a través de la dieta. Para el lactante, este aporte supondrá la protección frente al estrés oxidativo para el que su organismo no está todavía adecuadamente preparado.

Este aporte antioxidante de la leche suple los déficits de antioxidantes del neonato y le ayuda a combatir el estrés oxidativo propio de esta época y a reparar los daños producidos (Li, 2009). La capacidad antioxidante de la leche humana se ha relacionado con efectos tan importantes como la protección del desarrollo de la función cognitiva y el desarrollo psicomotor de los lactantes (Griffiths, 2002). Se ha demostrado que la capacidad antioxidante total (CAT) medida en el plasma de los lactantes amamantados es más elevada que la CAT de los recién nacidos no amamantados (Aycicek, 2006).

3. LECHE HUMANA, COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES

Cada vez hay mayor evidencia de que la alimentación en la infancia influye sobre diferentes procesos fisiológicos y metabólicos a corto, medio y largo plazo e influye *a futuro* sobre la aparición de algunas enfermedades.

Durante la etapa neonatal, la leche materna es el alimento más completo para cubrir las necesidades específicas del recién nacido y lactante. Y, esta etapa es la única en la que el ser humano dispone de nutrientes específicos (de especie) y por tanto idóneos para el organismo inmaduro y en pleno proceso de formación de órganos y tejidos.

3.1 TIPOS DE LECHE MATERNA

Clásicamente se habla de tres tipos de leche, basados en la diferencia de composición láctea que ocurre en las primeras semanas de lactancia:

El **calostro** que la mama produce durante los primeros días después del parto es un fluido espeso y de color amarillento debido a la alta concentración de betacarotenos. Su volumen puede variar entre 2-20 mL por toma en los 3 primeros días, lo que es suficiente para cubrir las necesidades nutricionales del recién nacido. Su valor calórico medio es de 67 Kcal/100 mL y contiene mayor cantidad de proteínas (inmunoglobulinas) (Ballard & Morrow, 2013), vitaminas A, E, K, ácido siálico, colesterol y algunos minerales (sodio, hierro, zinc, azufre, potasio, manganeso, selenio) que la leche madura (Lawrence, 2005). Es fundamental para el recién nacido por su composición nutricional y por su elevado contenido en factores defensivos: antiinfecciosos y antioxidantes como los betacarotenos, inmunoglobulinas A, lactoferrina, linfocitos y macrófagos. Contiene gran cantidad de flora bifidógena para colonizar el intestino neonatal y prebióticos que la favorecen y que, junto a los factores de defensa, son capaces de evitar la adherencia de microorganismo patógenos en el tubo digestivo neonatal. Así, aporta enzimas que ayudan al funcionamiento y maduración del sistema digestivo del lactante, facilitan

la evacuación del meconio y disminuyen el riesgo de hiperbilirrubinemia en el recién nacido (Lawrence, 2007). Y es la que aporta gran cantidad de células madre pluripotenciales (Hassiotou, 2014).

Se llama **leche de transición** a la leche producida entre el 4º y 15º día posparto y cuyo volumen aumenta progresivamente hasta alcanzar alrededor de los 600-700 mL/día entre el 8º y 15º día posparto. Se llama así porque su composición varía a lo largo de los días aumentando progresivamente el contenido en agua, lactosa y grasas y disminuyendo proporcionalmente el de proteínas (incluyendo el de inmunoglobulinas) hasta que por aspecto y composición, alrededor de los 15 días, la leche pasa a ser llamada leche madura (Ballard & Morrow, 2013).

Finalmente, a partir de los 15 días postparto, se habla convencionalmente de **leche madura**, aunque su composición continua evolucionando a lo largo de la lactancia (Ballard & Morrow , 2013; Andreas et al., 2015). La producción media de una madre con un solo lactante se sitúa alrededor de 700-900 mL/día (Lawrence 2005).

Los principales componentes de la leche madura son: agua, lactosa, galactosacáridos, proteínas y compuestos nitrogenados, grasa, minerales y vitaminas. También contiene elementos traza, enzimas, aminoácidos, hormonas, células vivas, mRNA y flora bacteriana. Con un pH=7, su aporte energético oscila entre 70 y 76 Kcal/100mL. Contiene un 88 % de agua, lo que asegura un aporte suficiente al lactante durante los primeros 6 meses de vida (Lawrence, 2005; Wojcik, 2012).

3.2 COMPONENTES DE LA LECHE HUMANA

Para el propósito de esta tesis se aborda la composición de la leche humana, principalmente desde el punto de vista de su contenido y funciones antioxidantes, campo este en el que aún queda mucho por investigar hasta caracterizar completamente todas las sustancias antioxidantes presentes en la leche humana y sus funciones.

- Hidratos de carbono (HC)

El principal HC de la leche humana es la lactosa (6-7 g/100 mL). Es sintetizada en la glándula mamaria a partir de glucosa y galactosa y contribuye al 40% de las calorías de la leche materna. Es necesaria para la absorción del calcio, hierro, magnesio y otros elementos y como aporte energético (Ares et al., 2016). La galactosa obtenida del desdoblamiento a nivel intestinal de la lactosa y otros azúcares como glicoesfingolípidos son imprescindibles para la formación entre otros de los galactolípidos, indispensables para el desarrollo del sistema nervioso central del recién nacido. La leche humana contiene glucosa, galactosa, L-fucosa y ácido siálico en concentraciones de 1-40 mg/l. El contenido total en oligosacáridos oscila entre 600-900 mg/dL. Además de la importancia de los oligosacáridos como parte de glucolípidos (esfingolípidos y gangliósidos) y glicoproteínas, para la formación de tejido nervioso y en la defensa antiinfecciosa, cada vez cobra mayor interés la capacidad antiinflamatoria que aportan al recién nacido que puede contribuir a la baja incidencia de enfermedades inflamatorias en el neonato amamantado (Newburg, 2014). A ello probablemente contribuye el aporte de otros oligosacáridos y amino azúcares que promueven la colonización intestinal por flora bacteriana bifidógena (*Lactobacillus Bifidus*), que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, hongos y parásitos (Lawrence & Lawrence, 2010; Newburg, 2014).

- Fracción nitrogenada

La leche madura contiene compuestos nitrogenados (la llamada fracción nitrogenada) en una concentración de 0,9 gr/100 mL. La fracción proteica (principalmente caseína, seroproteínas y mucinas) procede tanto de secreción glandular como de ultrafiltración del suero materno. La proporción lactosuero/caseína es de 80/20 en calostro, pero esta proporción va cambiando para ser de 60/40 a las pocas semanas y finalmente se mantiene en 50/50 la mayor parte de la lactancia (Lonnerdal, 2003). La alfa-lacto albúmina constituye el 10 a 12% del total de las proteínas, interviene en la síntesis de lactosa y es específica de la leche

materna. Otras proteínas representativas del lactosuero son la seroalbúmina, la lactoferrina y las inmunoglobulinas A, G y M (Lonnerdal, 2010).

La leche materna contiene gran cantidad de **inmunoglobulinas**. La IgA es la más abundante (constituye el 90 % de todas las inmunoglobulinas de la leche materna) y está presente en mayor cantidad en el calostro. Tanto IgA como IgM son segregadas en la glándula mamaria y tienen una importante función defensiva, ya que la producción propia en el lactante no alcanza niveles maduros antes de los 2 años (Lawrence, 2007).

La **caseína** constituye el 30-40% de las proteínas de la leche humana, y está presente en una concentración media de $3,4 \pm 0,97$ g/L que no varía a lo largo de la toma (entre leche de inicio y del final) aunque sí es variable entre madres. Su función principal es el aporte de aminoácidos, fósforo y calcio. La fracción beta-caseína es la más abundante y es bien digerida por el intestino neonatal al formar coágulos más pequeños que los de la caseína de la leche de otras especies animales, como la vaca. Prácticamente ausente de la leche humana en los primeros días, empieza a sintetizarse a partir del 3-4 día y las concentraciones aumentan progresivamente a medida que la leche es madura. La leche de mujer contiene solo 2 fracciones de caseína: la beta y la kappa caseína (no contiene ni alfa ni gamma caseína) (Cervato, 1999). La beta caseína es la más abundante, de elevada fosforilación, forma complejos fosfopeptídicos más solubles, con el Ca_2^+ que contribuyen a la elevada biodisponibilidad del calcio en la leche humana. La K-caseína, es una glicoproteína que contiene residuos de ácido siálico cargados negativamente, está presente en menor cantidad que la beta caseína y su principal función es estabilizar la micela de caseína, asegurando en su interior al fosfato cálcico. Inhibe la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal neonatal al actuar como un receptor análogo, por ejemplo del *Helicobacter Pylori* (Lonnerdal, 2010). La importancia antioxidante de las caseínas radica en su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, posiblemente a través de un aumento de la auto-oxidación del hierro. Además los péptidos resultantes de la digestión de la caseína tienen una elevada capacidad para secuestrar el anión superóxido. (Lonnerdal, 2003; Li, 2009).

La **lactoferrina** está presente en concentración elevada en calostro (hasta 7 g/L) y su concentración se estabiliza en 1-3 g/L de los 6 a los 24 meses. Su contenido es proporcional al de proteínas totales en leche y varía a lo largo de la lactancia. Las madres con recién nacidos a término tienen mayor concentración de lactoferrina en calostro (54%) que en leche madura (28%) (Lonnerdal, 2010). Esta relación se invierte tras un parto prematuro (en los que se ha observado un 28% en calostro e incrementos de hasta un 34% en leche madura) (Ronayne, 2000). Se han descrito niveles bajos de esta proteína en la leche de madres desnutridas, pero no en relación con el déficit materno de hierro (Sánchez, 1992). Esta proteína es un potente antioxidante capaz de limitar la producción de RLs y prostaglandinas, bloquear el factor de transcripción NF-Kb, la producción y suelta de citoquinas, de NO y de factor estimulador de granulocitos (GCSF) (Lonnerdal, 2010). Inhibe el crecimiento y colonización por diversas bacterias patógenas (acción bacteriostática) en el tracto gastrointestinal (*E. Coli*), bloquea la adhesión/penetración de bacterias y virus, favorece el crecimiento de bifido bacterias y disminuye la patogenicidad de muchas bacterias, virus y hongos (Hanson, 2009). También estimula el crecimiento y la proliferación de la mucosa intestinal neonatal y disminuye la respuesta inflamatoria local. La lactoferrina de la leche se ha asociado a diversas acciones antiinflamatorias y anti-infecciosas más allá del tracto digestivo (Lawrence, 2007; Hanson, 2007).

La **lisozima** constituye una importante fracción de las proteínas del lactosuero de la leche humana y su concentración es mayor en el calostro. El contenido de lisozima en la leche humana es más estable y 3000 veces más elevada que en la leche de vaca. Tras los primeros días, los niveles bajan de 85 a 90 mg/mL en calostro, a 25 mg/mL entre las semanas 2ª y 4ª, con una elevación progresiva posterior durante los primeros 6 meses hasta alcanzar un nivel meseta de 250 mg/mL que se mantiene durante los primeros 24 meses de vida. No se ha demostrado que las madres malnutridas tengan menores niveles de lisozima en su leche (Lawrence, 2010). La lisozima ofrece protección contra la oxidación aguda y crónica por mecanismos que abarcan desde la supresión de ROS hasta la modificación de

respuesta genética. Esta molécula es capaz de elevar los niveles normales de reservas antioxidantes y confiere resistencia frente a los RLs y ROS al disminuir la expresión de los genes p66 y cJun que determinan la respuesta al estrés oxidativo (Liu, 2006). Además participa en la detoxificación de los productos de glicación avanzados (AGEs); secuestra, recicla y disminuye sus actividades proinflamatorias, y mejora la defensa antioxidante.

La leche humana es rica en **aminoácidos libres como la cisteína**, cuya importancia antioxidante radica en su papel como precursor del glutatión. De hecho es la única leche con una relación 1/1 metionina/cisteína (Waly, 2012). Los niveles en leche humana aumentan de 1-3 $\mu\text{mol/dL}$ en calostro a 3-6 $\mu\text{mol/dL}$ en leche madura (Lawrence, 2010). El contenido de cisteína en plasma en los lactantes amamantados de 12 semanas, es significativamente mayor que en lactantes no amamantados (Miner, 2000).

Se han detectado niveles significativos de **enzimas antioxidantes** en leche humana hasta los 12 meses al menos (Lindmark-Masson, 2000; Friel, 2011), aunque los estudios son escasos y no se sabe bien cómo influyen otros factores (como la dieta, el tabaquismo o el uso de suplementos) en su contenido. La **catalasa** presente en la leche humana puede modular la respuesta oxidativa, reduciendo el citocromo C y consumiendo agua oxigenada (Grazioso, 1996). La **superóxido dismutasa** cataliza la desactivación del radical superóxido y su actividad está positivamente correlacionada con la ingesta de cobre en los prematuros. Su concentración en leche materna es mayor en la leche de madres de RN a término y aumenta en los primeros 3 meses de lactancia tanto en madres de RN a término como en las madres de prematuros. Se han observado niveles en leche que multiplican de 10 a 25 veces los niveles plasmáticos (L'Abbe, 2000). El contenido en leche materna de **glutatión oxidasa** (GPx) puede llegar a quintuplicar los niveles séricos maternos. Su contenido continua aumentando desde los primeros días y al menos durante las primeras 12 semanas postparto y es mayor en la leche de madres de lactantes a término en comparación con madres de prematuros (L'Abbe, 2000). Se ha observado una relación positiva entre los niveles de esta enzima y los de ácidos grasos

poliinsaturados en la leche humana, habiéndose especulado sobre el papel protector de la misma frente a la oxidación de estas moléculas (Ezaki, 2008).

La elevada actividad de estas enzimas contribuye de modo significativo a la capacidad antioxidante de la leche humana y previenen la oxidación de sus ácidos grasos libres además de proveer de oligoelementos. También se ha especulado sobre el papel protector que estas enzimas podrían tener al pasar directamente e intactas al plasma neonatal, como ocurre con otras proteínas como la apolactoferrina (L'Abbe, 2000). También contribuyen a esta capacidad antioxidante otros factores inhibidores de enzimas pro-oxidantes, como la α 1-antitripsina, la α 1-antiquimotripsina, el inhibidor de la elastasa o la acetilhidrolasa del PAF (Lawrence, 2007).

Los **nucleótidos, nucleósidos y ácidos nucleicos**, constituyen aproximadamente entre el 15-20% de la fracción nitrogenada no proteica de la leche materna. Aunque pueden ser sintetizados endógenamente y reciclados durante los procesos metabólicos, su presencia en la dieta neonatal es importante especialmente en situaciones de demanda y actividad metabólica elevadas, como enfermedad, infección, crecimiento rápido y otros estrés fisiológicos (Lawrence, 2007). Estos factores favorecen el crecimiento de las bifidobacterias, mejoran el crecimiento, desarrollo y reparación de la mucosa gastrointestinal y pueden potenciar la secreción de inmunoglobulinas y otros factores antiinflamatorios.

Las **poliaminas** participan en el crecimiento y maduración del sistema digestivo y son sintetizadas activamente por la glándula mamaria durante la lactancia. En la leche humana se ha aislado espermidina, espermina y putrescina. Los niveles en la leche aumentan bruscamente (de 8 a 12 veces) en los primeros días de lactancia y luego se estabilizan a niveles más bajos, a lo largo de todo el periodo de amamantamiento. Aunque se han observado variaciones inter madres, se desconocen los factores que influyen sobre las mismas (Larqué, 2007). **Espermina y espermidina** tienen acciones antiglicación significativas y es muy probable que contribuyan al bajo nivel de compuestos glicosados presentes en el plasma de los lactantes amamantados (Dittrich, 2006). Una concentración de espermina en leche

por debajo de 2 nmol/mL se ha relacionado con un aumento de riesgo del 80% para el desarrollo posterior de alergia, mientras que el riesgo disminuyó a 0% con concentraciones superiores a 13 nmol/mL (Dandrifosse, 2000).

La concentración de **tiorredoxinas** es mayor en leche que en el suero materno. Las concentraciones en calostro llegan a ser entre 7 y 10 veces mayores y son aún más elevados en la leche de madres con recién nacidos pretérmino (Todoroki, 2005).

La leche materna contiene diversos factores de crecimiento (IFG-1, EGF, EFV, HGF y FGF entre otros), más abundantes en el calostro que en la leche madura que estimulan la proliferación celular, la síntesis de ADN y ARN y el crecimiento y maduración de ciertos órganos pero también y como resultado provocan un aumento de sustancias oxidadas como el glutatión o la metilación del ADN (Murphy, 1998; Ozgurtas et al., 2010; Waly et al., 2012)

La leche humana contiene **polifenoles**, como la daidzeína y genisteína (Li, 2009) y **flavonas e isoflavonas** cuyos niveles se han incrementado hasta 14 veces tras la ingesta materna de una bebida de soja (Frankee et al., 2006).

Algunas **prostaglandinas** presentes en la leche como la PGE₁ y PGE₂ tienen importantes propiedades antioxidantes.

- Lípidos

La leche materna contiene entre un 3 y un 5 % de lípidos y es el componente sujeto a mayor variabilidad interpersonal. La grasa aporta entre un 40 a 50 % del total de calorías de la leche materna, aporta vitaminas y ácidos grasos esenciales y favorece su absorción. La absorción de la grasa de la leche en el intestino del lactante supera el 90% (Lawrence, 2005).

La grasa en la leche materna se encuentra en forma de micelas. Las micelas de grasa están formadas por una tricapa externa formada por fosfolípidos, triglicéridos y lipasa y una pequeña cantidad de citoplasma del lactocito. Esta tricapa se forma debido a los procesos, primero de endocitosis (para la captación de lípidos desde el plasma materno hacia el interior del lactocito) y después de exocitosis al segregar la

grasa hacia la luz del alveolo mamario (Abrahamse et al., 2012). En los repliegues de la tricapa micelar se encuentran importantes cantidades de lipasa (Michalski, 2013; Delplanque et al., 2015) que, al activarse en el tracto intestinal neonatal, contribuye a la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en el interior del glóbulo graso. Esta hidrólisis facilita la absorción de ácidos grasos libres y glicerol. Dichos ácidos grasos libres juegan un papel importante en la protección antiinfecciosa y antiinflamatoria del neonato (Pfaender et al., 2013; Delplanque et al., 2015).

Los principales lípidos de la leche materna son los triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos y esteroides. Los triglicéridos representan el 99% del total de los lípidos de la leche y están compuestos por ácidos grasos y glicerol. El aporte de ácidos grasos esenciales de la leche humana proviene de los lípidos circulantes en el suero materno. Pero estos, a su vez, provienen de la dieta, de los depósitos maternos y en menor medida de neosíntesis en la glándula mamaria. Y, debido a todo ello, la proporción de ácidos grasos varía en relación a la dieta materna (Delplanque et al., 2015)

La leche humana es también rica en ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-3 como el ácido linolénico (precursor del ácido docosahexaenóico (DHA)) y el ácido eicosapentaenóico (EPA), ambos con un importante papel en el desarrollo del sistema nervioso central y de la agudeza visual (principalmente el DHA). También contiene ácidos grasos omega-6 como el ácido linoléico (este representa entre el 8 a 16% de los ácidos grasos) que también, participa en el desarrollo del sistema nervioso y es precursor del ácido araquidónico (a su vez precursor de hormonas, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) (Delplanque et al., 2015).

Aunque se ha descrito que el contenido en colesterol de la leche humana disminuye en concentración con niveles más elevados en calostro (31 mg/100 mL) que en leche madura (16 mg/100 mL), resultados de investigaciones recientes han hallado variaciones individuales en relación no solo con el estadio de lactancia sino con la dieta materna, la edad, la estación y el lugar de residencia de la mujer lactante (Kamelska, 2012).

- Vitaminas

El contenido en vitaminas de la leche materna está destinado a cubrir las necesidades nutricionales del lactante, y varía, especialmente para algunas, con el estado nutricional y el aporte dietético.

Durante los primeros años las necesidades de **vitamina A y carotenoides** son elevadas respecto a otras épocas de la vida y al nacimiento ni siquiera los recién nacidos a término tienen suficientes depósitos de vitamina A, cuyo aporte exógeno (a través de la leche materna) es imprescindible. La leche materna contiene vitamina A en forma de esteroides de retinol (60% en forma de palmitato y estearato) y de carotenoides. Además de carotenoides precursores de vitamina A, se han aislado en la leche humana más de 30 carotenoides adicionales que aunque carecen de actividad pro-vitamina A poseen importantes cualidades como antioxidantes.

Los **carotenoides** presentes en la leche son fundamentalmente α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína/zeaxantina y licopeno y los tres primeros constituyen más del 50% (Gossage et al., 2002). Tanto carotenoides como vitamina A son transferidas directamente a la glándula mamaria vía quilomicrones o lipoproteínas. Los niveles son más elevados en el calostro (Haskell & Brown, 1999) y disminuyen en las primeras semanas tras el nacimiento, aunque el descenso no es igual para todos los compuestos (Macías & Schweigert, 2001). El contenido medio se sitúa en $236,7 \pm 121,9$ ng/mL de carotenoides, $1,02 \pm 0,56$ μ g/mL de vitamina A y $0,08 \pm 0,01$ μ g /mL de trans-retinol. No obstante, se ha descrito que el contenido de retinol y de carotenoides en la leche humana puede presentar grandes variaciones, cuando se comparan poblaciones de diferentes países. Estas variaciones se atribuyen en gran parte a variaciones dietéticas (Olafsdottir et al., 2001; Canfield et al., 2003, Ares et al., 2016).

Parece que a partir del primer mes postparto, los niveles se estabilizan incluso en mujeres malnutridas, pero en estas el contenido de vitamina A es inferior (50 μ g/dL frente a 75-60 μ g/dL). Si la madre carece de fuentes dietéticas adecuadas de vitamina A, la elevada tasa de transferencia de la misma hacia la leche podría originar

una depleción de sus propias reservas. Las mujeres multíparas y vegetarianas tienen niveles más elevados de carotenoides (Haskell & Brown, 1999) y también se ha descrito que es posible que si la madre aumenta la ingesta de alimentos ricos en vitamina A (por ejemplo, hígado de bacalao, alimentos ricos en carotenoides o alimentos fortificados) es posible observar un aumento en los niveles de vitamina A de su leche (Olafsdottir et al., 2006; Mello-Neto et al., 2009).

El aporte de **vitamina E** de la leche materna es crítico para la protección antioxidante del neonato especialmente del RN pretérmino o del RN enfermo (Lee & Davis, 2011). Los niveles de vitamina E en neonatos son muy bajos al nacimiento (Baydas et al., 2002) y menores aún en los recién nacidos pretérmino que adolecen de una baja relación de vitamina E con respecto al contenido en lípidos y por tanto tienen una elevada susceptibilidad al daño oxidativo. Todos los tipos de isómeros de **tocoferoles y tocotrienoles** que constituyen la vitamina E se encuentran presentes en la leche humana. El α -tocoferol de la leche se encuentra asociado a los lípidos de la membrana del glóbulo de grasa en cantidades tres veces superiores a las del interior del glóbulo lo que podría indicar la importancia de proteger dicha membrana de la oxidación. Es el compuesto más abundante con niveles entre $2,32 \pm 0,11 \mu\text{g}/\text{mL}$ y $11,8 \pm 6,3 \mu\text{g}/\text{mL}$ (Macías & Schweigert, 2001) y representa el 76,5% del total. Además contiene γ -tocoferol (19,8%) y δ -tocoferol (4,7%) (Szlagałtyś-Sidorkiewicz et al., 2012).

Aunque la capacidad antioxidante total de la leche humana madura está directamente relacionada con su contenido en alfa-tocoferol, el resto de los compuestos tienen una importante actividad antioxidante, previenen la peroxidación lipídica (especialmente de los ácidos grasos saturados de la membrana celular), la oxidación de la vitamina A y de muchas enzimas, proteínas y del ADN (Romeu, 2006). Los niveles de vitamina E en leche materna están fuertemente relacionados con la ingesta materna de vitamina E (dieta o suplementos) y con los niveles de carotenoides. Algunos autores han observado que a lo largo de la lactancia la concentración de estos compuestos en la leche disminuye: los niveles de

vitamina E en calostro son de 1.5 mg/dL, de 0.9 mg/dL en leche de transición y de 0.25 mg/dL en leche madura (Szlagatys-Sidorkiewicz et al., 2012):

La concentración de **vitamina D** en la leche materna es baja, pero es mayor que la concentración hallada en la leche de vaca sin suplementar. El contenido en **vitamina K** es mayor en el calostro y en la leche de transición en comparación con la leche madura.

La leche materna aporta **complejo vitamínico B** en forma de cobalamina (B12), piridoxina (B6), tiamina (B1), ácido fólico (B9), niacina (B3) y ácido pantoténico (B5). Los niveles en leche de estas vitaminas son muy dependientes del estado nutricional materno, y del aporte dietético durante la lactancia. Por esto por ejemplo las mujeres veganas deben suplementar su alimentación con este complejo vitamínico, especialmente vitamina B12, para asegurar aportes adecuados en su leche.

La leche materna contiene alrededor de 4-5 mg/100 mL de **vitamina C**. Los niveles de vitamina C en la leche humana dependen de muchos factores entre otros de la ingesta materna de vitamina C y el estadio de lactancia. Se ha descrito que las madres, con dietas pobremente equilibradas o muy restrictivas pueden tener niveles de vitamina C en su leche demasiado bajos para asegurar un aporte adecuado para sus hijos (Romeu, 2006). Y se ha observado que es posible aumentar los niveles de vitamina C en la leche con suplementos cuando los niveles séricos maternos son bajos. Sin embargo, por encima de un determinado nivel de saturación aumentar los suplementos no se traduce en un aumento de los niveles en leche. Todo ello sugiere la existencia de un mecanismo de regulación intrínseca para la transferencia de vitamina C desde la dieta a la leche, que prevendría cargas excesivas, probablemente para proteger al neonato de los efectos pro-oxidantes de cantidades elevadas de vitamina C (Hoppu, 2005).

El contenido medio de vitamina C en el calostro es 70 mg/L, en leche de transición de 60 mg/L y en la leche madura de 40 mg/L. Durante los primeros 6 meses de lactancia el contenido en la leche de la madre varía de 115 a 35 mg/L con una media de 50 mg/L y el contenido al final del primer año es un 10% menor (IOM,

2000). En lactantes con lactancia materna exclusiva desde el nacimiento hasta los 6 meses no se han observado niveles inadecuados de vitamina C y sí se ha descrito una relación inversa entre niveles elevados de vitamina C en la leche materna y el riesgo de atopia del lactante amamantado (Hoppu et al., 2005). La vitamina C de la leche ayuda al mantenimiento de la barrera natural frente a la infección, estimula las actividades fagocíticas y antibacterianas de los leucocitos, aumenta la producción de Igs y estimula la secreción de interferón (Li et al., 2009).

- **Minerales**

La leche materna contiene los minerales que necesita el lactante y además su biodisponibilidad (especialmente para el calcio, el hierro, el magnesio, el cobre y el zinc) es muy alta por lo que no son precisos niveles elevados de minerales, lo que evita la sobrecarga renal de solutos, promueve el buen funcionamiento renal, y favorece la capacidad metabólica del recién nacido (Mello-Neto et al., 2010).

La relación **calcio/fósforo** en la leche humana es de 2:1 y en esta forma son ambos fácilmente absorbidos por el lactante. Respecto al **hierro** presente en la leche humana, su biodisponibilidad es de aproximadamente el 50% como resultado de la presencia de lactoferrina, la acidez del tracto gastrointestinal del lactante y la presencia de zinc y cobre. La lactosa y la vitamina C también favorecen su absorción (Mello-Neto, 2010). El contenido de **zinc** en la leche materna tampoco es elevado gracias a su elevada biodisponibilidad.

La leche humana es rica en **selenio** y los lactantes amamantados tienen niveles séricos de selenio más elevados que los alimentados con fórmula. Casi el 30% del selenio de la leche forma parte de la glutatión peroxidasa que con ella protege a sus ácidos grasos omega-3 de la oxidación. Pero, además, esta enzima constituye una excelente fuente de seleno-cisteína y tras ser captada a nivel intestinal, pasa a integrar las reservas antioxidantes del RN (Watts et al., 2009). De forma aislada el selenio puede ser considerado como un elemento traza en la leche humana al estar

presente en cantidades mínimas, aunque los niveles de este mineral en leche humana parecen variar según la población estudiada, habiéndose descrito una concentración media de $16,3 \pm 4,7$ ng/mL en España. Esta concentración en leche está claramente relacionada con la dieta materna y se ha observado que los niveles en leche aumentan si la madre suplementa su dieta con levadura enriquecida en selenio o seleno-metionina, consume pescado fresco, en mujeres con dietas ovo-lacto-vegetarianas o aquellas que habían enriquecido su alimentación con selenio (Valent et al., 2011). Los niveles de este mineral, también varían a lo largo de la toma y la leche del final es más rica en selenio ($16,7$ ng/mL) que la del principio ($15,7$ ng/mL) (IOM, 2000). Las recomendaciones de aporte diario según el Instituto de Medicina de los EEUU (IOM) serían de 15 µg/mL (basada en la ingesta observada entre los lactantes amamantados (IOM, 2000).

Se conoce muy poco sobre las necesidades de **manganeso** de los lactantes, (Matos et al., 2009). Los niveles de manganeso en la leche humana disminuyen a lo largo del primer mes, desde $5,4 \pm 1,6$ µg/dL en los primeros días a $2,7 \pm 1,6$ µg/dL en la leche del día 28. Se ha calculado una ingesta media de alrededor de 2 mg/día con una tasa de absorción del manganeso a partir de la leche humana ($8,2\% \pm 2,9\%$) muy superior a la observada en otras leches (Lawrence & Lawrence, 2010).

3.3 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA

La leche humana posee una elevada capacidad antioxidante y contiene sustancias antioxidantes que no aporta ningún otro alimento en ninguna otra época de la vida. Todo este contenido antioxidante tiene la misión de ayudar a proteger el estado oxidativo del neonato.

Está protegida de la oxidación y del enranciamiento de sus componentes, muy probablemente, debido a que está destinada a ser consumida casi a la par que es producida. Hoy en día, esto no siempre puede ser, debido a la incorporación de la mujer al trabajo y el almacenamiento y refrigeración/congelación de leche puede ser

una ayuda para mantener la lactancia. En estos casos, hay estudios que aconsejan minimizar el tiempo de almacenamiento a menos de 24 horas antes de su consumo (Miranda et al., 2011) y la congelación antes que la refrigeración para prevenir la peroxidación de lípidos en la leche almacenada (Miranda et al., 2004). De hecho, hay un estudio en el que se evalúa la actividad de la glutatión peroxidasa y la concentración del malondialdehído en muestras de leche materna congeladas a -20º y a -80º durante varios periodos de tiempo. El estudio concluye que para conservar al máximo las propiedades antioxidantes de la leche es aconsejable congelarla a -80º y durante un periodo inferior a 30 días (Silvestre et al., 2010).

Los antioxidantes de la leche humana, una vez ingeridos por el RN, son capaces de actuar a nivel local, protegiendo el tracto respiratorio e intestinal (protección de las células epiteliales) y a nivel general (reducción espontánea del citocromo C) (Davis et al., 2010, Davies 1995; Ezaki et al., 2008).

Se han observado niveles mayores de antioxidantes en calostro y se ha observado que disminuyen en los días y meses posteriores al nacimiento (Gossage et al., 2002). Esto ha sido interpretado por algunos autores, como una respuesta del organismo materno a las necesidades más elevadas de su hijo, en los primeros días de vida (Ochoa et al., 2003).

Con la leche, el niño recibe un aporte de antioxidantes mayor y más variado que el que cualquier dieta podría ofrecerle. Compuestos antioxidantes que en otras épocas de la vida dependen de la producción propia, como enzimas, coenzimas, prostaglandinas o factores inhibidores de enzimas pro oxidantes, son aportados por la leche materna. Esta característica contribuye a la importantísima protección que el amamantamiento confiere, superior a la de cualquier sustituto (Friel et al., 2011). Este aporte, se adapta además a necesidades especiales, como demuestra el hecho de que la capacidad antioxidante y la presencia de algunos antioxidantes (alfa tocoferol y glutatión peroxidasa) son mayores en la leche de la madre de prematuros (Lindamrk-Mansson, 2000; Li et al., 2009).

Por otra parte, la leche humana posee también capacidad bactericida, proporcionando defensa y protección contra las infecciones al neonato. Esta capacidad antimicrobiana puede verse alterada durante su almacenamiento. (Silvestre et al., 2006; Silvestre et al., 2008).

4. MASTITIS

En la actualidad, la lactancia materna está siendo objeto de un renovado interés en los países desarrollados, debido a los beneficios que este tipo de alimentación proporciona al binomio madre-hijo a corto, medio y largo plazo (Schack-Nielsen L et al., 2005). De hecho, en plena era de la nutrigenómica, la leche humana se ha convertido en una inagotable fuente de sorpresas. Actualmente se sabe que ciertos componentes de la leche materna ejercen efectos beneficiosos a largo plazo, pero solo cuando el individuo tiene contacto con ellos durante los primeros meses de vida (Picó C et al., 2007). Por otra parte, todavía desconocemos la función de gran parte de los más de 100 compuestos bioactivos que contiene la leche humana y que no están representados en las fórmulas infantiles. En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses y que, llegada esta edad, el destete se realice de forma gradual, de manera que la lactancia se mantenga durante un tiempo no inferior a los 2 años (OMS, 2001).

Hoy en día, es difícil encontrar a un profesional de la salud, un padre o una madre que no reconozcan que la leche materna es «lo mejor» para el recién nacido. Sin embargo, con demasiada frecuencia cualquier problema surgido al inicio o durante la lactancia como es el caso de las mastitis, supone el primer paso hacia el abandono de esta (García Casanova et al., 2005).

Las dos principales causas de la mastitis son el estancamiento de la leche y la infección. El estancamiento de la leche es habitualmente la causa primaria y esta puede acompañarse o progresar hacia la infección o no hacerlo (Hughes et al., 1989).

Gunther reconoció a partir de la observación clínica que la mastitis resultaba del estancamiento de la leche dentro del pecho y que la extracción eficaz de la leche conforme se producía podía prevenir en gran parte esta afección. Esta autora sugirió que la infección, cuando ocurría, no era primaria, sino que se producía a partir de la

leche estancada, la cual proporcionaba un medio de cultivo para el crecimiento bacteriano (Gunther et al., 1958).

Thomsen y cols. aportaron en 1984 pruebas adicionales de la importancia del estancamiento de la leche. Realizaron un recuento de leucocitos y bacterias en la leche de las mamas con signos clínicos de mastitis y propusieron la siguiente clasificación:

	Leucos < 10 ⁶ /mL leche	Leucos > 10 ⁶ /mL leche
Bacterias < 10 ³ /mL leche	ESTANCAMIENTO DE LECHE	MASTITIS NO INFECCIOSA
Bacterias > 10 ³ /mL leche		MASTITIS INFECCIOSA

Tabla 2. Clasificación según Thomsen

Thomsen y sus cols. también relacionaron los recuentos de células y bacterias con los hallazgos clínicos y encontraron que era imposible averiguar a partir de los signos clínicos, si había o no había infección. (Thomsen et al., 1984).

- a) **estancamiento de leche** (leucos <10⁶/mL leche y bacterias <10³/mL leche)

El estancamiento de la leche ocurre cuando la leche no se extrae del pecho eficazmente. Esto puede ocurrir cuando los pechos se ingurgitan precozmente después del parto, o en cualquier momento cuando el bebé no extrae la leche que se produce bien de una parte o de todo el pecho. Las causas incluyen mal agarre del niño al pecho, succión ineficaz, restricción de la frecuencia o duración de las tomas y bloqueo de los conductos lácteos. Los signos clínicos son una masa dolorosa en el pecho, a menudo con

enrojecimiento de la piel en dicha zona y habitualmente las mujeres no tienen fiebre y se encuentran bien (Minchin et al., 1998).

b) **mastitis no infecciosa** (Leucos $>10^6$ /mL leche y Bacterias $<10^3$ /mL leche)

Cuando no se vacía la leche de parte o de todo el pecho, dicha leche acumulada puede originar una respuesta inflamatoria (Lawrence et al., 1999). La leche normalmente contiene citoquinas tanto inflamatorias como antiinflamatorias. Se cree que las citoquinas antiinflamatorias y otros factores protegen al niño (Dinarello, 1984; Soder, 1987). Pero las citoquinas inflamatorias, tales como la interleuquina 8 (IL-8), pueden ser más importantes para proteger al pecho de la infección. Durante la mastitis se ha encontrado un aumento de los niveles de IL-8 en el pecho, y es un signo de que está ocurriendo una respuesta inflamatoria. (Filteau et al., 1999; Willumsen et al., 2000). Esta inflamación es la responsable de los signos y síntomas de la mastitis: parte del pecho está doloroso, enrojecido, hinchado y endurecido; y la mujer a menudo tiene fiebre y se siente enferma (Amir et al., 1999).

c) **mastitis infecciosa** (Leucos $>10^6$ /mL leche y Bacterias $>10^3$ /mL leche)

La mastitis infecciosa se produce si no se resuelve el estancamiento de la leche y se vence la protección proporcionada por los factores inmunitarios de la leche y por la respuesta inflamatoria. La leche humana fresca no es habitualmente un medio adecuado para el crecimiento bacteriano (Novy et al., 1984) y para que ocurra la infección deben existir condiciones que impidan al pecho destruir y eliminar bacterias. Podría esperarse que la dirección natural del flujo de leche a lo largo de los conductos, cuando se extrae eficazmente, eliminase cualquier organismo hacia el exterior del pecho. El vaciamiento ineficaz de la leche, que conduce a la acumulación de

ésta, crea las condiciones favorables para el crecimiento bacteriano y permite que se superen los procesos antiinfecciosos.

En un estudio controlado (Thomsen et al., 1984) observaron que el problema de estancamiento de la leche mejoró solo con el amamantamiento continuado, la mastitis no infecciosa requirió tratamiento mediante la extracción adicional de leche después de la toma, y la mastitis infecciosa se trató eficazmente solo mediante la extracción de la leche y antibióticos sistémicos. Sin la extracción eficaz de la leche, es más probable que la mastitis no infecciosa progrese a mastitis infecciosa y la mastitis infecciosa hacia la formación de un absceso. Una reciente revisión pone de manifiesto que no existe una evidencia científica sobre la eficacia de los antibióticos en las mastitis (Jahanfar et al., 2013 y 2016).

Las mastitis son más frecuente en la segunda y tercera semana posparto (Creasy et al., 2004), y la mayoría de los estudios indican que el 75-95% de los casos ocurren en las primeras 12 semanas (Walker et al., 1999; Say et al., 2016). Sin embargo, puede producirse en cualquier momento de la lactancia.

La incidencia de esta enfermedad oscila, según los diferentes estudios, entre el 3 y el 33% de las madres lactantes (Foxman et al., 2002; Jahanfar et al., 2016). En España se estima en torno al 10% (Díaz et al., 2004), aunque se carece de datos epidemiológicos. Posiblemente, esta cifra sea algo mayor en realidad, según indican diversas asociaciones de lactancia materna. En cualquier caso, se trata de una patología común entre las madres lactantes y que, con excesiva frecuencia, conduce a un abandono precoz e innecesario de la lactancia.

Habitualmente, el pecho está enrojecido, doloroso, hinchado y endurecido, y puede haber síntomas generales de fiebre y malestar.

El dolor se debe a que las bacterias se disponen en forma de películas biológicas (biofilms) en el epitelio de los acinos y los conductos galactóforos. Si la concentración bacteriana rebasa los límites biológicos, la luz de los conductos se

reduce, de manera que la presión que ejerce la leche sobre un epitelio que está inflamado es considerablemente mayor.

Como consecuencia de ello, cuando se va acumulando la leche en los conductos o cuando se produce la eyección de esta, se siente un dolor intenso en forma de «pinchazos» (Figura 21).

En ocasiones, algunos de los conductos se pueden llegar a obturar completamente, lo que provoca una retención de leche que empeora los síntomas locales (dolor, endurecimientos focales) (Figura 21). Cuando la obturación se produce en alguno de los conductos que drenan al exterior en el pezón, se puede llegar a observar a simple vista, ya que la leche fluye por un número menor de poros que en condiciones normales. En ocasiones, estas obstrucciones forman unas estructuras características, integradas por calcio y bacterias, conocidas como «ampollas de leche». Conviene recordar que el calcio es un elemento que fomenta la formación de biofilms y, obviamente, la presencia de este catión en la leche es tan inevitable como imprescindible para el correcto desarrollo del niño. Desde el punto de vista práctico, los niños pueden mostrarse más irritables o nerviosos durante el amamantamiento, ya que les cuesta bastante más esfuerzo y tiempo obtener la misma cantidad de leche (Delgado et al., 2009).

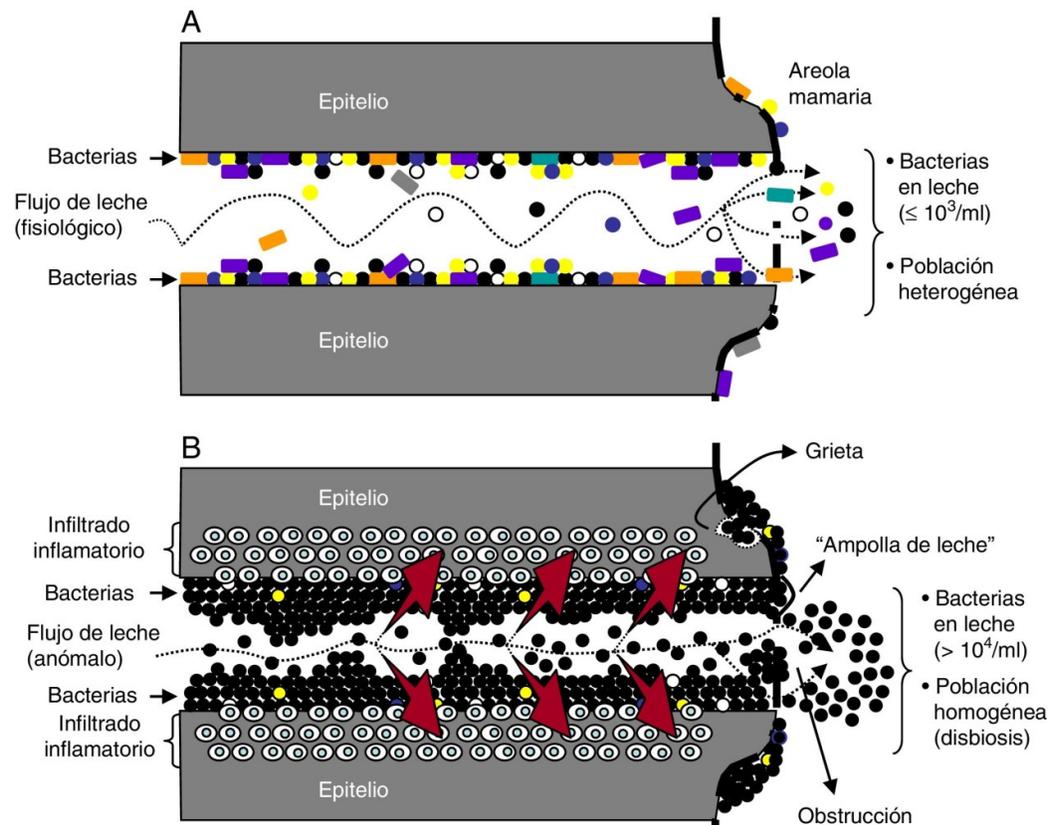


Figura 21. Representación esquemática del epitelio y los conductos mamarios en condiciones fisiológicas (A) y en una situación de mastitis (B). Las flechas rojas indican el aumento de presión de la leche al pasar por una luz disminuida. Esta presión sobre una zona inflamada es la responsable de los típicos «pinchazos». Delgado, 2009.

Los principales agentes etiológicos de mastitis infecciosas pertenecen a dos géneros, *Staphylococcus* y *Streptococcus* (OMS, 2000), que en los últimos años se han visto sometidos a grandes cambios taxonómicos que han implicado la identificación de nuevas especies, la reclasificación de otras e incluso la creación de nuevos géneros. Los estafilococos son, con diferencia, las bacterias implicadas en un mayor porcentaje de casos ($>75\%$). Entre ellos, *Staphylococcus aureus* se ha considerado tradicionalmente como el prototipo de especie causante de mastitis (Riordan & Nichols, 1990; Stafford et al., 2008; Viduedo et al., 2015; Deng et al., 2017).

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que los estafilococos coagulasa-negativos, con *S. epidermidis* a la cabeza, pueden constituir la primera

causa de mastitis desde el punto de vista cuantitativo. Este hecho se ha observado reiteradamente en mastitis bovinas, ovinas y caprinas (Solthys et al., 1999; Thorberg et al., 2006), y la situación parece similar en las mastitis humanas (Jimenez et al., 2006; Bakhshandeh-Nosrat et al., 2007). De hecho, se ha sugerido que las cepas de *S. epidermidis* que causan mastitis en vacas tienen un origen humano (Thorberg et al., 2006), ya que esta especie está ausente o es muy rara en la piel o las mucosas bovinas (Watts et al., 1989; White et al., 1989).

Es más, la inoculación de cepas de *S. epidermidis* aisladas de casos de mastitis humana en las glándulas mamarias de ratonas lactantes provoca la aparición de mastitis (Thomsen, 1985). A pesar de ello, en los pocos casos en que los servicios de microbiología hospitalarios analizan muestras de leche, *S. epidermidis* se considera, por defecto, como una bacteria «saprófito» o «comensal», incluso cuando constituye un monocultivo y se encuentra en una concentración superior a 10⁵/mL. Se olvida con gran facilidad que las infecciones producidas por *S. epidermidis* suelen estar asociadas al uso de catéteres y sistemas de drenaje (Aldea-Mansilla et al., 2006; De Silva et al., 2002) y que, precisamente, la glándula mamaria durante el final del embarazo y la lactancia constituye un complejo sistema de drenaje.

El segundo grupo bacteriano implicado en estos procesos infecciosos es el de los estreptococos, ya que, solos o asociados a estafilococos, se encuentran en un 10-15% de los cuadros de mastitis. El papel de los estreptococos en las mastitis humanas debería ser cuidadosamente reevaluado. En algunos estudios se indica que la especie estreptocócica que se aísla con más frecuencia en casos humanos es *Streptococcus agalactiae* (Rench et al., 1989), tal como sucede también en las mastitis bovinas. Sin embargo, la práctica revela que la presencia de tales especies en mastitis humanas es rara y que, por el contrario, es más frecuente la de otras especies, como *Streptococcus mitis*, *S. salivarius* e, incluso, *S. pneumoniae* (Wüst et al., 1995).

Por otro lado, muchos pediatras, matronas y asociaciones de lactancia creen, injustificadamente, que *Candida albicans* es una de las principales causas de mastitis o de dolor en los pezones. De hecho, gran parte de las muestras sospechosas de

mastitis que se analizan proceden de mujeres a las que se les ha administrado antifúngicos por vía oral y/o tópica durante un tiempo prolongado sin mejoría, o incluso con un empeoramiento del cuadro clínico (Delgado et al., 2009). En este caso, la revisión bibliográfica de los casos de mastitis atribuidos a *Candida* spp. demuestra la falta de evidencias para llegar a tal diagnóstico (Carmichael et al., 2002). *C. albicans* es el agente causal de la candidiasis oral (muguet) en niños. Sin embargo, y a diferencia de lo que sucede con los estafilococos y estreptococos, la glándula mamaria no es precisamente un ecosistema adecuado para su crecimiento. De hecho, el aislamiento de levaduras en casos de mastitis es muy raro.

Quizás el mito de la candidiasis mamaria provenga del hecho de que en un pequeño porcentaje de casos (5-6%) coexisten una mastitis estafilocócica en la madre y una candidiasis oral en su hijo. Obviamente, un niño con muguet transfiere levaduras a la piel del pecho de la madre, lo que explica que en la leche de estas mujeres se pueda detectar una pequeña concentración de levaduras (<100 unidades formadoras de colonias [UFC]/mL). Ello no justifica que, ante una concentración de levaduras de 50 UFC/mL y una concentración superior a 500.000 estafilococos/mL, se llegue a un diagnóstico de candidiasis (Delgado et al., 2009).

Finalmente, resulta sumamente revelador el hecho de que las levaduras no se hayan descrito hasta la fecha como causa de mastitis en ninguna otra especie de mamíferos (Carmichael et al., 2002), a pesar de que, por su repercusión económica, los estudios etiológicos de mastitis sean mucho más completos y complejos en medicina veterinaria que en medicina humana.

En cuanto a estudios relacionados con la composición de la leche y mastitis, no hay casi bibliografía en humanos. Hay un estudio realizado a 30 mujeres (15 con mastitis y 15 control) en el que se observa una disminución de la producción de leche así como de la grasa, los carbohidratos y la energía en la leche de las madres con mastitis (Say et al., 2016). Por otro lado, un estudio realizado en mujeres peruanas (38 controles y 36 mastitis) muestra que no hubo diferencias significativas en cuanto al volumen de la leche ni tampoco en la concentración de proteínas totales (Zavaleta et al., 1995).

En un estudio realizado en ratas con mastitis, se observa que las mastitis pueden producir una alteración en las enzimas antioxidantes (concretamente disminución de las enzimas superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa, glutatión reducido y catalasa) y un aumento de la peroxidación lipídica que se observa a través de un aumento del nivel de malondialdehído (MDA) (Eslami et al., 2015). Estos mismos resultados fueron obtenidos en otros estudios similares, uno realizado en vacas (El-Deeb, 2013) y otro realizado en cabras (Li-Li & Qingzhang, 2009).

Tradicionalmente el tratamiento empleado en las mastitis consiste en la eliminación eficaz de la leche, analgesia y terapia con antibióticos. En cuanto a dicha terapia antibiótica, otro estudio plantea que el uso de probióticos (*Lactobacillus fermentum* y *salivarius*) parece ser una alternativa eficaz al uso de antibióticos comúnmente prescritos para el tratamiento de las mastitis (Arroyo et al., 2010; Fernández et al., 2014).

5. PROPIEDADES NUTRITIVAS Y APORTE ANTIOXIDANTE DE LOS ARÁNDANOS

5.1 ASPECTOS BOTÁNICOS (TAXONOMÍA)

El arándano rojo, también denominado arándano rojo americano o *cranberry*, es el fruto de la especie *Vaccinium macrocarpon* perteneciente al género *Vaccinium* L. y de la familia *Ericaceae* (Figura 22).



Figura 22. *Vaccinium macrocarpon*

La planta es un arbusto enano o enredadera leñosa, de tipo perenne, de crecimiento lento y con una altura de 10 a 20 cm. Es nativa del este de Estados Unidos, aunque se han introducido plantas silvestres en la Costa del Pacífico.

El 30% de los terrenos destinados a la producción de arándano comercial, son selecciones de la planta silvestre de *V. macrocarpon* (Strik et al., 2002).

Los tallos de la planta son rastreros, delgados y presentan una longitud hasta de un metro. Éstos recorren la superficie donde se cultiva formando una estera gruesa. A partir de las yemas axilares de estos tallos rastreros, surgen ramas verticales rectas que tienen una altura de 5 a 7 cm. Las raíces son muy finas y fibrosas, y carecen de pelos radiculares, por lo que suelen asociarse con hongos formadores de micorrizas. Este sistema radicular es muy superficial y permite a la planta vivir y desarrollarse en suelos húmedos y pantanosos.

Las hojas son perennes, con una longitud de entre 1 y 2 cm, con una forma oval-alargada y de aspecto coriáceo. La lámina de la hoja tiene márgenes enteros y son ligeramente revolutas, presentan un color verde claro en el envés o cara abaxial y verde más oscuro en el haz o cara adaxial. Durante la etapa de crecimiento las hojas son de color verde intenso, mientras que en la temporada de latencia donde predominan temperaturas más frías, las hojas se vuelven de un color marrón rojizo.

Las flores tienen forma de campana y son de color rosado con pétalos recurvados que dejan expuestos los estambres. En cada tallo vertical pueden aparecer de 2 a 7 flores. Los frutos son bayas subesféricas inicialmente blancas que tornan a color rojizo rosado o carmesí brillante al madurar. Tienen un diámetro de 9 a 14 mm y de aspecto liso. La epidermis de la baya es firme y sólida, y debido a estas propiedades el fruto puede aguantar varios meses después del cosechado sin deteriorarse. Los frutos son comestibles y presentan un sabor amargo. En el interior de la baya aparecen lóculos que albergan a las semillas, cuyo número varía de 0 a 50. (Reduca, 2014)

5.2 UTILIZACIÓN EN EL MERCADO O LA INDUSTRIA

La especie *V. macrocarpon* es comestible y la parte de la planta que se utiliza en la industria es el fruto. El fruto es de tipo baya, y este presenta una pulpa blanca, seca y astringente.

En la industria alimentaria, los arándanos rojos o *cranberries* se pueden consumir en fresco, deshidratados o en zumo. Estas bayas también se emplean en la industria alimentaria y farmacéutica como colorante y como conservante, deshidratadas o en forma de polvo para formulación en cápsulas que se comercializan como suplementos alimentarios.

En Norteamérica el 85-95% del cultivo del arándano rojo es destinado al procesado. La industria estima que el 90% de los arándanos procesados son destinados para zumo, y el porcentaje restante para salsas o para arándanos

deshidratados. La demanda de zumo de arándano rojo se incrementó después de que un artículo en 1994 del *Journal of the American Medical Association* confirmara que beber zumo de arándano rojo previene las infecciones en el tracto urinario (Avorn et al., 1994; Strik et al., 2002).

5.3 COMPOSICIÓN NUTRICIONAL Y COMPUESTOS CARACTERÍSTICOS

En la Tabla 3 se muestra la composición nutricional del arándano rojo americano.

<u>NUTRIENTES</u>	<u>UNIDADES</u>	<u>VALOR POR 100G</u>
Agua	g	87.13
Energía	kcal	46
Proteína	g	0.39
Lípidos totales (grasas)	g	0.13
Carbohidratos	g	12.20
Fibra alimentaria	g	4.6
total		
Azúcares	g	4.4
<u>AMINOÁCIDOS</u>	<u>UNIDADES</u>	<u>VALOR POR 100G</u>
Triptófano	g	0.003
Treonina	g	0.028
Isoleucina	g	0.033
Leucina	g	0.053
Lisina	g	0.039
Metionina	g	0.003
Cisteína	g	0.003
Fenilalanina	g	0.036
Tirosina	g	0.032
Valina	g	0.045
Arginina	g	0.056
Histidina	g	0.018
Alanina	g	0.049
Ácido aspártico	g	0.188
Ác. Glutámico	g	0.146
Glicina	g	0.048
Prolina	g	0.031
Serina	g	0.051
<u>MINERALES</u>	<u>UNIDADES</u>	<u>VALOR POR 100G</u>
Calcio, Ca	mg	8
Hierro, Fe	mg	0.25
Magnesio, Mg	mg	6
Fósforo, P	mg	13
potasio, K	mg	85
sodio, Na	mg	2
zinc, Zn	mg	0.10

<u>VITAMINAS</u>	<u>UNIDADES</u>	<u>VALOR POR 100G</u>
Vitamina C	mg	13.3
Tiamina	mg	0.12
Riboflavina	mg	0.20
Niacina	mg	0.101
Ácido pantoténico	mg	0.295
Vitamina B6	mg	0.057
Folato total	mg	1
Colina total	mg	5.5
Betaína	mg	0.2
Vitamina A	mg	3
Caroteno, beta	mg	36
Luteína+zeaxa ntina	mg	91
Vitamina E	mg	1.20
Tocoferol, gamma	mg	0.04
Vitamina K	mg	5.1
<u>LÍPIDOS</u>	<u>UNIDADES</u>	
Ácidos grasos saturados	g	0.011
Ácidos grasos monoinsaturad	g	0.018
Ácidos grasos poliinsaturados	g	0.055

Tabla 3. *Composición nutricional del arándano rojo.*
(Fuente: USDA National Nutrient Database for Standard Reference).

La composición nutricional del arándano rojo se puede ver afectada por la variedad, la región donde se cultive y las prácticas culturales.

Los arándanos presentan, además, un amplio espectro de sustancias bioactivas como vitamina C, vitamina A, β -caroteno y compuestos fenólicos. Entre los

compuestos fenólicos, los metabolitos que predominan son los flavonoides y, particularmente, las antocianinas.

Uno de los tipos de flavonoides característicos del arándano americano son las **antocianinas**. Se trata de pigmentos rosas, azules, rojos o morados que se encuentran presentes principalmente en los tejidos epidérmicos. Pueden estar presentes en diferentes formas en base al pH, el cual, de hecho, determina si estas son coloreadas o incoloras. El contenido en antocianinas tiende a incrementarse al mismo tiempo que la fruta madura, en respuesta a factores climatológicos como luz y temperatura (Cote et al., 2010).

Suelen encontrarse glicosiladas con varios azúcares que incrementan su estabilidad. La forma aglicón de las antocianinas, conocida como antocianidinas, es muy inestable (White et al., 2010). Existen principalmente 6 tipos de antocianidinas pero solo dos de ellas se encuentran de forma mayoritaria en el arándano americano, la cianidina y la peonidina. (Neto, 2007). (Tabla 4).

Entre los **flavonoles** cabe destacar la quercetina y mircetina. Al igual que las antocianinas, los flavonoles están normalmente glicosilados. Son típicamente incoloros, a diferencia de las antocianinas, pero absorben fuertemente la luz en la región del UV y aparecen de color amarillo a elevadas concentraciones (White et al., 2010; Bhagwat et al., 2014). (Tabla 4).

Otro flavonoide mayoritario presente en el arándano americano son los **flavan-3-ol**. Aparecen en la naturaleza como aglicones de catequina y epicatequina, lo suficientemente solubles para mantenerse sin glicosilación (Cote *et al.*; 2010). (Tabla 4).

Por último, contienen (PACs) (Figura 23), compuestos polifenólicos formados por oligómeros y polímeros de flavanoles unidos mediante un enlace simple entre C4 y C8 o entre C4 y C6 (ambos tipo B) (Feghali et al., 2012).

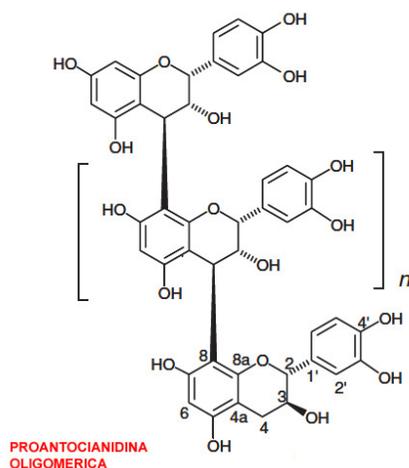


Figura 23. *Proantocianidina oligomérica*

Las PACs con enlaces de tipo A (presentan al menos un enlace intermolecular entre O7 y C2, además del enlace carbono-carbono) son menos comunes y se creen prácticamente exclusivas del arándano rojo americano (*Vaccinium macrocarpon*).

Las proantocianidinas diméricas tipo A son las más abundantes, seguidas de las triméricas tipo A, tetraméricas tipo A y otros polímeros de mayor peso molecular (tabla 4).

<u>NUTRIENTE</u>	<u>UNIDADES</u>	<u>VALOR POR 100G</u>
FLAVONOIDES		
<u>Antocianidinas</u>		
Cianidina	mg	46.4
Delfidina	mg	7.7
Malvidina	mg	0.4
Pelargonidin	mg	0.3
Peonidina	mg	49.2
<u>Flavan-3-oles</u>		
(+)-catequina	mg	0.4
(-)-epigallocatequina	mg	0.7
(-)-epicatequina	mg	4.7
<u>Flavonoles</u>		
Kaempferol	mg	0.1
Mircetina	mg	6.6
Quercetina	mg	14.8
<u>Proantocianidinas</u>		
Dímero A	mg	82,6
Dímero B	mg	4,4
Trímero A	mg	30,8
Trímero B	mg	1,5
Tetrámero A	mg	22,9

Tabla 4. *Composición de compuestos fenólicos. Tabla elaborada con la información procedente de: USDA National Nutrient Database for Standard Reference.*

5.4 EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS ARÁNDANOS EN LA SALUD

Existen claras evidencias que relacionan una dieta rica en frutas y verduras con beneficios para la salud (Urquiaga et al., 2017). A lo largo de este apartado estudiaremos los beneficios que los arándanos aportan a la salud.

5.4.1 Actividad antioxidante

El arándano americano se encuentra entre las frutas con mayor cantidad de antioxidantes debido a su gran contenido en flavonoides y su abundancia en ácidos

fenólicos, principalmente ácidos hidroxicinámicos y ácidos hidroxibenzoicos (Mullen et al., 2007).

En la actualidad existen numerosos estudios sobre el contenido de polifenoles en arándanos. Concretamente, en uno de estos estudios realizado en Valencia, se analiza el contenido de polifenoles solubles totales en arándanos frescos y derivados (néctar, zumos, arándanos desecados y pulpa). Han observado que los arándanos deshidratados o desecados presentan un mayor contenido de polifenoles solubles totales que los arándanos frescos, néctares, zumos o pulpas; asimismo, el producto desecado de arándanos negros *V. myrtillus* (Finlandia) es el de mayor concentración con 2336.9 mg/100g. A este le siguen los arándanos rojos desecados, *V. vitis-idaea*, (Finlandia) con 2201.5 mg/100g de polifenoles totales. Destacan también, los arándanos rojos deshidratados, *V. macrocarpon*, cuya concentración de polifenoles comprende entre 391.7 y 590.7 mg/100g; situándose en tercera posición de un total de 15 muestras analizadas (Anticono et al., 2016). Esta alta concentración de polifenoles totales en los arándanos desecados se debe a que durante el proceso de elaboración existe pérdida de agua concentrándose la materia sólida (Balasundram et al., 2006).

5.4.2 Actividad antiinflamatoria

Un estudio realizado en ratones con bayas Goji (*Lycium barbarum*), arándanos azules (*Vaccinium myrtillus*) y arándanos rojos (*Vaccinium macrocarpon*) concluye que los tres tipos de baya poseen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, aunque su mecanismo de acción durante el proceso inflamatorio es diferente (Nardi et al., 2016).

Otro estudio, realizado en conejos, concluye que los arándanos pueden prevenir la pielonefritis, gracias a su efecto antioxidante y antiinflamatorio que previene el daño a nivel renal (Han et al., 2007).

5.4.3 Actividad protectora frente a enfermedades degenerativas y riesgo cardiovascular

El consumo de este fruto a largo plazo podría prevenir la enfermedad del Alzheimer. Este efecto podría estar potenciado por la gran cantidad de compuestos fenólicos presentes en los arándanos, ya que estos compuestos han demostrado inhibir diversos procesos oxidativos (Shukitt-Hale, 2005; Neto, 2007; Mullen *et al.*, 2007).

Por otra parte, hay estudios con arándanos en los que se han obtenido mejoras significativas en la oxidación de las LDL, en las dislipemias, en el metabolismo de la glucosa y en la peroxidación lipídica. Estas ventajas se dieron tanto en sujetos sanos como en sujetos con riesgo cardiovascular. De ahí que los arándanos sean recomendados en dietas saludables para el corazón (Basu *et al.*, 2010; Blumberg *et al.*, 2016).

5.4.4 Actividad anticancerígena

Por otra parte, los flavonoles han demostrado contar con actividad anticancerígena, en concreto, la quercetina. Existen numerosas referencias sobre la habilidad de la quercetina contra la proliferación de las células cancerígenas, siendo clave su papel en la apoptosis de dichas células. Por tanto, la actividad anticancerígena del arándano americano podría estar ligada a la quercetina contenida en el fruto (Neto, 2007; Seeram, 2008).

El resveratrol, es un compuesto polifenólico que se encuentra en la piel de los arándanos y las uvas. Este componente además de poseer actividad antioxidante, cardioprotectora y anti-envejecimiento es capaz de inhibir el crecimiento de células cancerígenas induciendo la apoptosis de éstas (Boyer *et al.*, 2012)

5.4.5 Actividad antiséptica y antibacteriana

Hace una década, se identificó una proantocianidina de tipo A que inhibe la adherencia a la superficie de la pared del tracto urinario de una cepa uropatógena de tipo P de *Escherichia coli*. Esta adhesión a las células epiteliales se debe a unas proteínas denominadas adhesinas que se encuentran en las fimbrias de la bacteria que las convierte en patogénicas (Hancock et al., 2008; Dessi et al., 2011). Las proantocianidinas de tipo A parecen ser responsables de la acción antiséptica y antibacteriana del arándano. Debido a la presencia de estas PACs, el consumo de arándanos rojos contribuye a la prevención de infecciones del tracto urinario.

En nuevos estudios, se observa que las proantocianidinas tipo A junto con otros componentes de los arándanos, además de prevenir las infecciones urinarias, también pueden prevenir infecciones gastrointestinales producidas por *E. coli* (Blumberg, 2016).

II. Justificación

La leche materna, es fuente de numerosas moléculas bioactivas con funciones diversas, siendo el alimento más completo para compensar la inmadurez del organismo neonatal. Entre otros, la leche humana contiene cantidades nada despreciables de enzimas antioxidantes y diversos estudios muestran la superior capacidad antioxidante de la leche humana frente a la leche de fórmula. Además se ha demostrado que los recién nacidos tienen una mejor situación REDOX y sufren menos daño oxidativo cuando son alimentados con leche materna.

Aceptar el interés de asegurar la lactancia y de prolongarla durante el tiempo adecuado implica la necesidad de dar solución a aquellos factores que pueden suponer la interrupción de la misma, como lo es la mastitis. No existe apenas literatura que muestre los efectos de la mastitis sobre la composición de la leche materna. Más en concreto, no existe ningún estudio que muestre los efectos de esta patología sobre el estado oxidativo de la leche humana, haciendo especialmente relevante el trabajo planteado en esta tesis doctoral.

Asimismo, teniendo en cuenta la importancia de la capacidad antioxidante de la leche materna es necesario buscar tratamientos que permitan mejorarla en aquellos casos en los que se pudiera verse afectada. Los arándanos son frutos muy ricos en polifenoles y están considerados como una de las mayores fuentes de antioxidantes naturales. Por lo tanto, este fruto parece un candidato adecuado para mejorar la posible alteración del estado oxidativo de la leche de madres con problemas de mastitis.

Con estos antecedentes, la hipótesis que se plantea en este proyecto es:

III. Hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

La suplementación de la dieta materna con arándanos desecados durante la lactancia modifica la capacidad antioxidante de la leche materna en madres con mastitis.

Para comprobar la hipótesis anterior, este trabajo se plantea un objetivo general y tres objetivos específicos.

OBJETIVO GENERAL

Valorar si la suplementación de la dieta materna con un fruto desecado rico en antioxidantes como es el arándano, influye en el nivel del estado oxidativo de la leche materna de las madres con mastitis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar los hábitos alimentarios del grupo de población seleccionado y el valor nutritivo de su dieta.
2. Valorar el estado oxidativo de la leche de madres con mastitis en relación a madres sanas.
3. Comprobar si un suplemento nutricional como los arándanos es capaz de mejorar el balance oxidativo en la leche de las madres con mastitis.

IV. Material y métodos

1. MATERIAL

1.1. REACTIVOS

Los reactivos para las soluciones tamponadas, enzimas, coenzimas, son proporcionados por Sigma-Aldrich Corporation (St Louis, MO, USA) y por Boehringer Mannheim (Alemania). Los disolventes y otros reactivos de Scharlau (Barcelona, España), Merck (Darmstadt, Alemania). El agua utilizada en las determinaciones es de grado Milli-Q (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA).

1.2 SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA

Arándanos desecados marca “Hacendado” comercializados por Mercadona y cuya composición nutricional puede verse en la tabla 5.

VALOR NUTRICIONAL	POR 100G DE PRODUCTO
GRASAS (de las cuales)	0,5 g
Saturadas	0,1 g
Monoinsaturadas	0,2 g
Poliinsaturadas	0,2 g
HIDRATOS DE CARBONO (de los cuales)	83,2 g
Azúcares	68,9 g
FIBRA ALIMENTARIA	5,7 g
PROTEINAS	0,7 g
SAL	0,0 g

Tabla 5. Valor nutricional de los arándanos desecados marca “Hacendado” de Mercadona

2. EQUIPOS

Los equipos utilizados en el desarrollo de este trabajo, son los siguientes:

➤ **Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters compuesto por:**

- Bomba cromatográfica: Agilent Technology 1100 series binary HPLC Pump.
- Degasificador Agilent Technology de fases móvil serie 1100
- Detector de fluorescencia FLD Agilent Technology 1200 con celda de 8µL.
- Detector de Diodos (DAD) Diode Array Detection Agilent Technology 1100 series
- Inyector: Agilent Technology 1050 con loop de 100 µl.
- Ordenador IBM Window 2000 Pro.
- Software: HP ChemStation

➤ **Espectofotómetro:** Kontron Instruments modelo Uvikon 922

➤ **Centrífugas:**

- Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo SS-34
- Centrífuga refrigerada Heraeus, Megafuge 1.0
- Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5415 R
- Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Sepatech 200
- Centrífuga de mesa Heraeus Sepatech, modelo Labofuge Ae
- Hettich zentrifugen Universal 320 R

➤ **Balanzas:**

- Balanza de precisión Mettler, modelo AM-100
- Balanza Ohaus, modelo Navigator TM

➤ **Otros equipos:**

- pHmetro Crison, modelo microph 2001. Hamilton Liq-Glass
- Homogeneizador: Junke and Kunkel, IKA-Werk, modelo RW 20 DZM
- Sistemas de tratamientos de agua: Milli Q gradiente A10 de Millipore
- Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 y Barnstead/Lab-Line modelo Max Q 7000
- Agitadores magnéticos Minishaker IKA, modelo MS2, Heidolph modelo MR 3001 K y SBS modelo A-163, Lab-Line Instruments Inc. USA
- Lector de placas: Bio-Rad, modelo BENCHMAK, Microplate reader
- Ultracongeladores, congeladores y neveras

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio de intervención nutricional cuyo diseño experimental, incluyendo el tamaño muestral y los grupos a comparar se describen con detalle en el siguiente apartado.

3.2. POBLACIÓN DE ESTUDIO Y ÁMBITO

Mujeres sanas, con recién nacidos sanos, que acuden a la consulta del pediatra para seguimiento postnatal y ayuda con la lactancia materna.

En todos los grupos, las mujeres han sido captadas indistintamente en el Hospital Dr.Peset o en el centro de salud de Benicasim, con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:

3.2.1 Criterios de inclusión

- a) Madres sanas de un hijo sano a término con peso adecuado para la

edad gestacional, y mayor de 21 días, que alimentan a su hijo/hija con lactancia materna exclusiva, no fumadoras, no consumidoras de tóxicos, con estado nutricional normal y sin restricciones dietéticas específicas.

b) Que entendieran y hablaran español y aceptaran las condiciones del estudio:

- Acudir a dos visitas concertadas con la pediatra y aceptar una posible suplementación de la dieta con arándanos.

3.2.2 Criterios de exclusión

a) Alguna patología asociada

b) Necesidad de ingesta de medicación durante el seguimiento (a excepción del posible tratamiento con el antibiótico indicado para la mastitis).

c) Necesidades dietéticas especiales

d) Abandono de la lactancia materna exclusiva

Se realizó el seguimiento de las madres incluidas en los cuatro grupos que se describen a continuación:

- **Grupo C (control):** madres que cumplen los criterios de inclusión del estudio y que no presentan problema de dolor en la mama ni en pezón.
- **Grupo CA (control + arándanos):** madres que cumplen los criterios de inclusión del estudio que no presentan problema de dolor en la mama ni en pezón y, que acepten suplementar su dieta con 20 g de arándanos/día durante un periodo de 21 días.

- **Grupo M (mastitis):** madres que cumplen los criterios de inclusión del estudio y que presentan sintomatología dolorosa en la mama que no mejora tras asegurar un buen enganche al pecho y que no presentan grietas, ni abscesos.
- **Grupo MA (mastitis + arándanos):** madres que cumplen los criterios de inclusión del estudio que presentan sintomatología dolorosa en la mama que no mejora tras asegurar un buen enganche al pecho y que no presentan grietas, ni abscesos y que acepten suplementar su dieta con 20 g de arándanos/día durante un periodo de 21 días a partir de la detección del problema inflamatorio, junto con el tratamiento con antibióticos, en el caso que sea necesario prescribirlos.
- La asignación a un grupo suplementado con arándanos o sin suplemento, se realizó por método aleatorio, siguiendo un sistema alterno, de tal manera que a la primera madre se le dieron arándanos y a la siguiente no, excepto en el caso de que alguna no quisiera, de modo que se les asignaba a las dos siguientes. Los arándanos fueron proporcionados por parte del equipo investigador.

3.3. TAMAÑO MUESTRAL

Realizamos el cálculo del tamaño muestral en base a la diferencia esperada en la capacidad antioxidante total de la leche materna para un error alfa del 20% y un error beta del 10%. Se obtuvo un tamaño muestral necesario de 60 madres. Por ello, en nuestro estudio participaron un total de 60 madres, 30 sanas y 30 con mastitis. La mitad de las madres sanas y la mitad de las madres con mastitis fueron suplementadas con arándanos. Al final todas las madres quedaron asignadas en uno de los cuatro grupos descritos anteriormente: C, CA, M y MA; quedando una n de 15 por grupo.

3.4. REQUERIMIENTOS ÉTICOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

Al invitarlas a participar, las mujeres fueron informadas de las condiciones y posibles inconvenientes derivados de su participación en el estudio verbalmente y por escrito y las madres firmaron un consentimiento informado (Anexo 1).

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Hospital General de Castellón (Anexo 2) y por el del Hospital Dr. Peset de Valencia (Anexo 3).

3.5. SEGUIMIENTO

Durante el seguimiento del estudio hubo 2 contactos con cada madre participante, bien en el centro de salud de Benicasim o en la unidad de Lactancia Materna del Hospital Dr. Peset de Valencia.

a) Primera visita:

- Captación: Informe sobre objetivos del estudio, características y exigencias de la participación.
- Firma de consentimiento informado por las madres.
- Recogida de somatometría de la madre: peso y talla.
- Asignación a uno de los cuatro grupos.
- Entrega de 2 bolsas de arándanos deshidratados (en madres control + arándanos y mastitis + arándanos).
- Entrega de formularios e instrucciones para recoger “3 registros dietéticos de 24 horas” (Anexo 4)
- Recogida de la 1ª muestra de leche.
- Citación para la siguiente visita.

b) Segunda visita (a los 21 días):

- Repaso de la información recogida de los registros dietéticos de 24 horas durante tres días.

- Recogida de la 2ª muestra de leche materna
- Fin de seguimiento.

4. MÉTODOS

4.1. ENCUESTA DIETÉTICA

a) Registros Dietéticos de 24 Horas

En el primer contacto se instruyó a las madres para que recogieran 3 registros dietéticos de 24 horas, anotando todos las bebidas y alimentos consumidos durante tres días (dos laborables y un festivo). Se procuró estimar con el mayor detalle posible las cantidades mediante modelos normalizados y con medidas utilizadas comúnmente (vaso, taza, tazón, plato, cuchara) procurando identificar con mayor precisión los datos recogidos, estimando el tipo y cantidad de alimentos, la forma de cocinado y el tamaño de las raciones.

Las madres entregaron los registros cumplimentados al acudir a la segunda visita.

b) Análisis dietético

La composición nutricional de las dietas maternas se obtuvo mediante el software para el cálculo dietético '*Alimentador 2000*' desarrollado por la Sociedad Española de Dietética y Ciencias de la Alimentación (SEDCA).

4.2. ENSAYOS CON MUESTRAS DE LECHE MATERNA

4.2.1. Recogida, transporte, conservación y procesado de las muestras

Se tomaron muestras de leche de las madres con y sin mastitis al principio y final del estudio. La recogida de la muestra se realizó bajo condiciones estándar de

extracción de la leche, utilizando un sacaleche eléctrico Medela, proporcionado por la casa Medela. Cada madre recogió tres tubos o alícuotas (5-10mL/alícuota) destinadas a las determinaciones del metabolismo oxidativo. Estas muestras se congelaron de forma inmediata hasta su recogida por parte de la doctoranda que las transportó en hielo seco hasta el laboratorio de la Universitat Jaume I, donde se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento para realizar las pertinentes determinaciones bioquímicas.

La filiación de los datos se mantuvo anónima y el grupo al que pertenecían las muestras permaneció oculto para la doctoranda que realizó los análisis de las muestras.

4.2.2. Estado oxidativo. Análisis de laboratorio

El estudio analítico de las muestras se realizó en los laboratorios de la Universitat Jaume I. Para el estudio del estado oxidativo de las muestras de leche sólo se tuvieron en cuenta aquellas muestras en las que se pudo verificar, mediante cultivo microbiológico, la presencia de patógenos y por tanto la necesidad de tratamiento farmacológico.

4.2.2.1 *Estado oxidativo*

4.2.2.1.1 Estudio del daño inducido a macromoléculas en la leche de la madre

a) Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas

La oxidación proteica se mide por la cuantificación de los grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos, según procedimiento desarrollado por Levine et al. (1980) con algunas modificaciones de Tian et al.

(1998). La DNFH unida a proteínas se cuantifica colorimétricamente ($\epsilon_{373}=21.10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

Tomamos 800 μL de leche y los centrifugamos a 13600 rpm durante 10 minutos. A 200 μL del sobrenadante se añadieron 400 μL de 2,4 dinitrofenilhidracina (DNFH) 10 mM /CIH 2,5 M (muestras) y a 200 μL de sobrenadante se añadieron 400 μL de CIH 2,5 M (blancos). Incubamos 1 hora a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Centrifugamos a 12600 rpm durante 3 minutos y añadimos 1 mL de TCA al 20 %. De nuevo centrifugamos a 12600 rpm durante 3 minutos. Recogemos el pellet y lo lavamos 3 veces con 1 mL de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v). Centrifugamos otra vez a 12600 rpm durante 3 minutos y recogemos el pellet. Posteriormente, al pellet añadimos 1 mL de Guanidina 6 N a pH: 2,3, agitamos con un vortex durante 2 minutos y centrifugamos a 12600 rpm. Finalmente medimos el sobrenadante a una $\lambda= 373 \text{ nm}$ frente a una solución de guanidina. Para los cálculos restamos a la absorbancia de la muestra la del blanco.

b) MDA por HPLC

Para la cuantificación del malondialdehído de las muestras de suero e hipocampo, se utiliza una modificación del método de Richard (Richard et al., 1992) modificada por el grupo de investigación (Romero et al., 1998), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en base a la reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Kromasil C18 5 μm de 250 x 4,6 mm (Análisis Vínicos S.L.). El flujo de la fase móvil es de 1 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 sg.

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 μm de poro y 47 mm de diámetro.

La solución madre de calibración se prepara diariamente. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol absoluto.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0.1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 min en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos a 4°C durante 10 min con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm.

Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza unos minutos antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar se centrifuga durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de HPLC.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,25; 0,5; 1 y 2 μM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

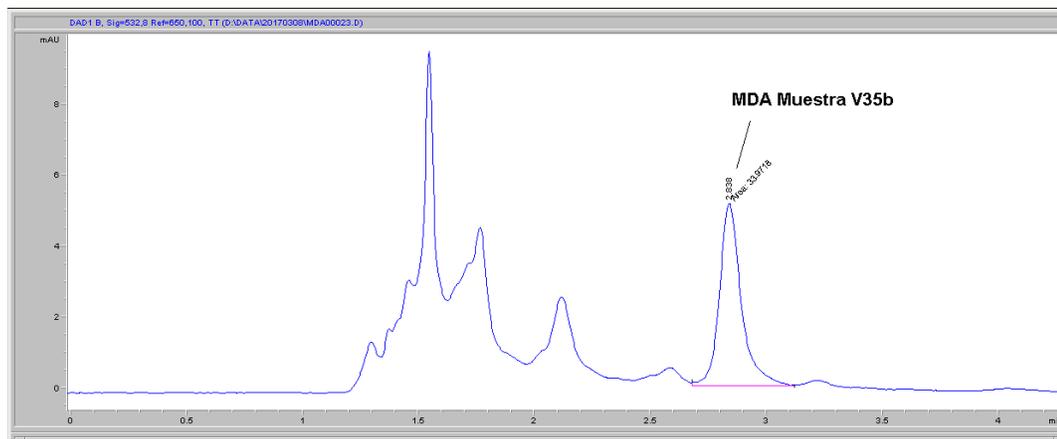


Figura 24. Ejemplo de un cromatograma de la determinación de MDA

4.2.2.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante en la leche

➤ **Determinación de la capacidad antioxidante total**

a) Método del ABTS

Para la determinación de la capacidad antioxidante total se siguió el método $ABTS^{\bullet+}$ de Miller y Rice Evans (Miller, 1997) modificado por Pellegrini (Re, 1999), basado en la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sal diamónica del ácido sulfónico) por el persulfato potásico para formar el radical $ABTS^{\bullet+}$, el cual es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. El $ABTS^{\bullet+}$ tiene un color verde azulado que absorbe luz a 734 nm y pierde el color al pasar de nuevo a su forma reducida tras la acción de las sustancias antioxidantes presentes en el líquido estudiado, en este caso la leche materna. Este radical reacciona con casi todos los antioxidantes, hidrofóbicos o hidrófilos y no se ve afectado por fuerzas iónicas.

La generación del reactivo $ABTS^{\bullet+}$, se realizó mezclando ABTS 7mM con la solución de persulfato potásico 2.45 mM en una proporción 1:1 v/v.

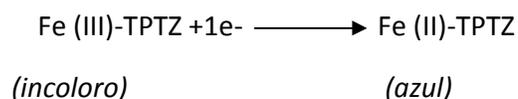
Para realizar la determinación se añadieron 20 μ L de muestra y 980 μ L de reactivo de $ABTS^{\bullet+}$. Se realizó un blanco de muestra con 20 μ L de muestra + 980 μ L de agua miliQ. Posteriormente, se determinó la actividad antioxidante total

espectrofotométricamente a 734 nm. Los resultados fueron expresados como TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). La recta de calibrado con Trolox se realizó a partir de una solución estándar de Trolox.

b) Método del FRAP

Este método se basa en el estudio del poder reductor de la muestra de leche, basado en el método de Benzie y Strain (1996).

Se fundamenta en la capacidad de reducir el Fe (III) hasta Fe (II), mediante la siguiente reacción:



Mediante un donante de electrones (antioxidante) se forma un compuesto de color azul que presenta un máximo de absorción a 593 nm. La medida espectrofotométrica a esa longitud de onda es proporcional a la capacidad reductora de la muestra.

Se preparó la mezcla de reactivo con acetato sódico 300 mM, pH: 3,6, TPTZ (2, 4, 6- Tris (2-pyridyl)-S-triazine) 40 mM, FeCl₃ 20 mM en una proporción 1/1/1; v/v/v. A 970 µL de la mezcla de reactivo se añadieron 30 µl de leche materna, posteriormente la mezcla es incubada a 37°C durante 30 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 4000 rpm y se procedió a su determinación espectrofotométricamente a 593 nm. Los resultados fueron expresados como µmoles de Fe²⁺ usando una recta de calibrado con diferentes concentraciones de FeSO₄.7H₂O.

4.2.2.1.3 Determinación de la defensa antioxidante

a) Determinación del contenido de POLIFENOLES TOTALES en la leche (Método de Folin-Ciocalteu)

Para medir el contenido total en polifenoles en las muestras de leche materna, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, 1999), que se basa en la oxidación de los polifenoles con el reactivo de Folin (mezcla de fosfomolibdenato y fosfotungstenato). Al mezclar la muestra de leche con el reactivo, se consigue la formación de un complejo azul cuya absorbancia se midió espectrofotométricamente a 750 nm.

Las muestras de leche descongeladas se centrifugaron a 12000g durante 5 minutos. A continuación se tomaron 500 µL de sobrenadante y se añadieron 100 µL de ácido metafosfórico 1.32 M para precipitar completamente las proteínas, se centrifugó a 2700 rpm durante 3 minutos y se recogió el sobrenadante. Se tomaron 20 µL del sobrenadante y se añadieron 80 µL de agua destilada y 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (1/10) diluido, la mezcla se agitó con un vortex durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 µL de la solución de carbonato de sodio al 7.5%, se agitó y se dejó reposar durante 40 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la muestra se midió espectrofotométricamente a 750 nm, utilizando como estándar el ácido gálico.

b) Contenido en glutatión (GSH)

La concentración de GSH en las distintas muestras se determina por el procedimiento descrito por Reed et al. (Reed et al., 1980). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos, seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzoceno), dando lugar a derivados N-DPN. Estos derivados son rápidamente separados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG, ácido glutámico y L-cisteína.

Las columnas cromatográficas de separación empleada es una precolumna de 10 x 4.0mm y columna de 250 x 4,6 mm 5 μ m, ProntoSIL 120-5-Amino-H, (Bischoff). Las condiciones iniciales del flujo son de 1 ml/min, 80 % de la fase móvil A y 5 % de la fase móvil B. Estas condiciones son incrementadas linealmente hasta el 95 % de la fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 minutos antes del análisis de la siguiente muestra. La temperatura de análisis se mantiene constante en un baño a 40°C.

La longitud de onda utilizada es de 352nm. El rango del detector DAD empleado es 8nm y línea base a 700nm con ancho de 100nm y el tiempo de respuesta de 0.1 segundos.

La fase móvil A se prepara con metanol a 80% y la fase B se prepara con acetato de amónico 5M en metanol al 80%. Posteriormente se filtran a través de un filtro-membrana (Scheider y Scuell) de 0,45 μ m de poro y 47mm de diámetro.

La solución madre de calibración está compuesta por GSH reducido 10mM (Sigma, España), se prepara diariamente y se mantiene a 4°C. La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético 100mM (Sigma, España) y m-cresol 0,2 mM (Acros). La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4dinitrobenzono) (Sigma, España) 1,5 % v/v etanol puro también se prepara cada día y se conserva a 4°C protegida de la luz.

El procedimiento parte de 100 μ l de muestra sobre los que se añaden 20 μ l de solución 1. Posteriormente cada mezcla se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO₃ 2,4 M (Sigma, España) en KOH 2M (Sigma, España). Incubamos durante 30 minutos a temperatura ambiente antes de la adición de 1-fluoro-2,4-dinitrobenzono para formar los derivados N-DNP los cuales requieren 4 horas en oscuridad a 4°C para su formación. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC.

En cada medida se prepara una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 60; 80; 100 μ M). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la

concentración de GSH en la muestra, que se calcula por interpolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

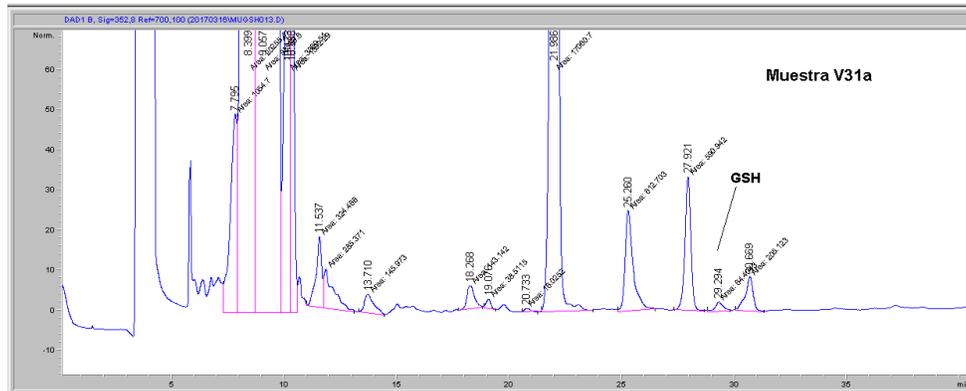


Figura 25. Ejemplo de un cromatograma de la determinación de GSH

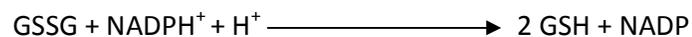
c) Actividad glutatión peroxidasa (GPx)

La actividad glutatión peroxidasa (GPx) se determinó según el método propuesto por Lawrence (Lawrence et al., 1978) frente al peróxido de hidrógeno. Está basado en las siguientes reacciones:

GSH Peroxidasa



GSH Reductasa



La formación del glutatión disulfuro (GSSG) está catalizada por la actividad GPx de la muestra, que es, a su vez, reducido de forma continua por un exceso de la actividad GSH reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación

de NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.2, que contiene EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM (Sigma, España)
- Solución B. GSH reductasa 2.4 U/mL (Sigma, España)
- Solución C. GSH 10 mM
- Solución D. NADPH 1.5 mM (Roche, España) disuelto en NaHCO₃ al 0.1% (Sigma, España)
- Solución E. H₂O₂ 1.5 mM (Sigma, España)

El procedimiento analítico consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

1. 550 µl de la solución A (tampón fosfato potásico).
2. 50 µl de muestra.
3. 100 µl de la solución de GSH reductasa (solución B).
4. 100 µl de la solución C.

Estas soluciones se preincuban durante 5 min a 37°C, tras lo cual se añaden 100 µl de la solución D Posteriormente el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos es monitorizado en un espectrofotómetro (Hewlet & Packard modelo 8452A Diode Array) durante 3 min. Finalmente, se añaden 100 µl de la solución E, y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min, que es resultado del consumo de NADPH.

El cálculo se realiza por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido:

$$c = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (\text{mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1})$$

Donde:

V_f = volumen final en ml

V_m = volumen de muestra en ml

ϵ = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de 6.22 mM⁻¹ x cm⁻¹)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

ΔA = disminución de la absorbancia a 340 nm

Δt = intervalo de tiempo considerado

Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

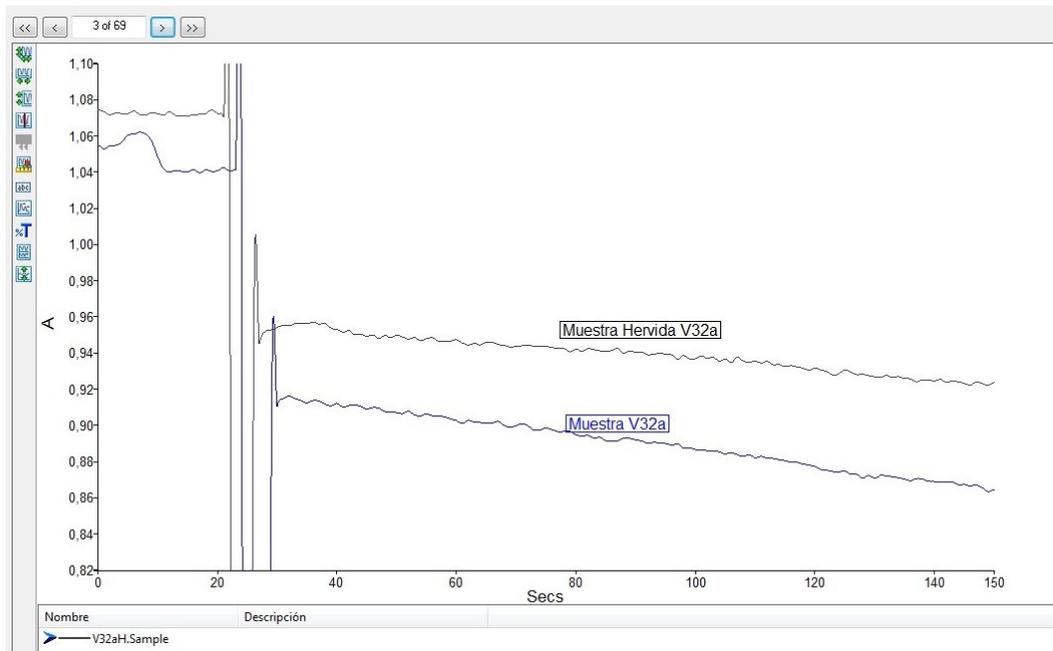


Figura 26. Ejemplo de un registro de la determinación de la actividad GPx

4.2.3 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS, v 24; (SPSS Inc., Chicago, IL.) para Windows.

Realizamos en primer lugar un análisis descriptivo de cada variable estudiada y estudiamos la normalidad de sus distribuciones con el test de Kolmogorov.

La medida de tendencia central utilizada en el presente trabajo fue la media aritmética, que se define como la suma de los datos dividida por el número de casos. La medida de dispersión de los datos utilizada fue la desviación estándar de la muestra.

Los resultados presentados referentes a dos grupos, control y mastitis (objetivo 2), fueron analizados con la Distribución t de “Student”. La prueba t para dos muestras permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias. El nivel de significación utilizado es de $p < 0.05$.

Además también existe la necesidad de comparar más de dos poblaciones, con el inconveniente del elevado número de comparaciones que hay que realizar (objetivo 3). Para resolver esto, utilizamos el análisis de la varianza, que contrasta simultáneamente todos los casos. El ANOVA de dos factores sirve por tanto para comparar varios grupos en una variable cuantitativa. A las variables categóricas que define los grupos que deseamos comparar se les llama independientes o factores, mientras que a la variable cuantitativa en la que deseamos comparar los grupos se la denomina dependiente. En nuestro caso tenemos dos factores (**tratamiento y tiempo**), uno de los cuales es con **medidas repetidas** (tiempo). Para simplificar el análisis, teniendo en cuenta que sólo hay dos medidas repetidas para el factor tiempo, se creó una nueva variable dependiente denominada “**cambio**” que representa la diferencia entre los valores obtenidos para la variable cuantitativa dependiente al inicio y al final del estudio. Esto nos permite realizar un ANOVA de un solo factor (tratamiento) para comparar la variable dependiente cuantitativa denominada “cambio”.

La hipótesis que se pone a prueba es que las medias poblacionales son iguales, si esto es así, significa que los grupos no difieren en la variable dependiente, y en consecuencia la variable dependiente es independiente del factor.

La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias, consiste en obtener un estadístico, llamado F, que refleja el grado de parecido entre las medias que se comparan. Cuanto más diferentes sean las medias, mayor será el valor de F.

La interpretación de este estadístico es la siguiente: si el nivel crítico asociado al estadístico es menor que 0,05 rechazaremos la hipótesis de igualdad de medias y concluiremos que no todas las medias poblacionales comparadas son iguales. En caso contrario, no podremos rechazar la hipótesis de igualdad.

En los casos en que se aplica este análisis y se descarta la hipótesis nula, hay que utilizar lo que se denomina un contraste post hoc a posteriori para averiguar qué medias en concreto difieren de qué otras.

En nuestro caso, la diferencia entre las medias de los distintos subgrupos se estimó mediante un contraste post hoc DMS si hay homogeneidad de varianzas o de T3 Dunnett si las varianzas no son homogéneas.

V. Resultados

1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTICIPANTES

En la tabla 6 se describen los datos antropométricos de las madres participantes en cada grupo: edad, peso, talla, IMC. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre grupos en los parámetros analizados.

	C	CA	M	MA
Edad	36,5 ± 4,1	33,8 ± 3,7	33,7 ± 3,9	36,4 ± 3,3
Peso	60,6 ± 7,2	64,6 ± 8,8	66,2 ± 10,5	63,9 ± 10,5
Talla	164,6 ± 4,7	165,5 ± 6,2	163,2 ± 4,8	164,6 ± 6,7
IMC	22,3 ± 2,5	23,6 ± 2,6	24,8 ± 3,9	23,6 ± 4

Tabla 6. Características antropométricas (los resultados están expresados en media ± desviación estándar de 60 madres lactantes)

2. INGESTA MATERNA HABITUAL ESTIMADA

2.1. MACRONUTRIENTES

A partir de los datos de los 3 registros dietéticos de 24 horas de cada madre se calculó la ingesta habitual de energía y de macronutrientes (Tabla 7). La energía ingerida por el grupo Control (C) fue de 1595 ± 394 Kcal y la del grupo Mastitis (M) de 1659 ± 248 kcal. En los grupos suplementados con arándanos (CA y MA) la ingesta fue de 1510 ± 265 kcal y 1631 ± 428 Kcal respectivamente. Al comparar la ingesta media de macronutrientes inter grupos no se observaron diferencias significativas.

Por otro lado, el análisis entre las Kcal diarias consumidas y las kcal diarias recomendadas de cada el grupo (2499 ± 136 (C), 2617 ± 136 (M), 2556 ± 150 (CA) y 2578 ± 154 (MA) no reveló diferencias significativas.

Media diaria	C	CA	M	MA
Kcal	1595 ± 394	1510 ± 265	1659 ± 248	1631 ± 428
Kcal recomendadas	2499 ± 136	2556 ± 150	2617 ± 136	2578 ± 154
HC (g)	166,2 ± 54,5	167,8 ± 48	191,2 ± 44,7	188,6 ± 40
Proteínas (g)	73,8 ± 15,9	71,6 ± 16	82,7 ± 12,5	80,8 ± 19,6
Grasa (g)	77,6 ± 23	67 ± 11,2	68,9 ± 16,7	68,2 ± 30,1
Colesterol (mg)	227,5 ± 76,3	238,7 ± 109,2	249,7 ± 90,6	231,8 ± 86,1
AGM (g)	44,5 ± 6	37,8 ± 7,1	42 ± 7,3	40,5 ± 6,3
AGP (g)	12,8 ± 2,8	11,7 ± 4,2	11 ± 2,1	10,9 ± 4,2
AGS (g)	14,4 ± 4,4	12,6 ± 2,4	14,2 ± 3,1	15,7 ± 3,9
Fibra (g)	12,4 ± 6	9,5 ± 3,5	14,6 ± 7,5	11,5 ± 5,6

Tabla 7. Ingesta de macronutrientes (los resultados están expresados en media ± desviación estándar de 60 madres lactantes. HC: Hidratos de carbono. AGM: ácidos grasos monoinsaturados. AGS: ácidos grasos saturados. AGP: ácidos grasos poliinsaturados)

Por otro lado, la ingesta de macronutrientes se comparó con la ingesta recomendada según el programa utilizado (Alimentador). De esta manera, por debajo del rango inferior se podría incurrir en déficit y por encima del rango superior aumenta el riesgo de enfermedades crónicas (Tabla 8 y figura 27). No se observaron diferencias estadísticamente significativas.

% Kcal	Rango recomendado de ingesta	C	CA	M	MA
HC	50-55%	40%	43%	45%	45%
Proteínas	10-12%	18%	18%	19%	19%
Grasas	30-35%	42%	39%	36%	36%

Tabla 8. Ingesta media de macronutrientes en función de la ingesta calórica. Los resultados están expresados en %

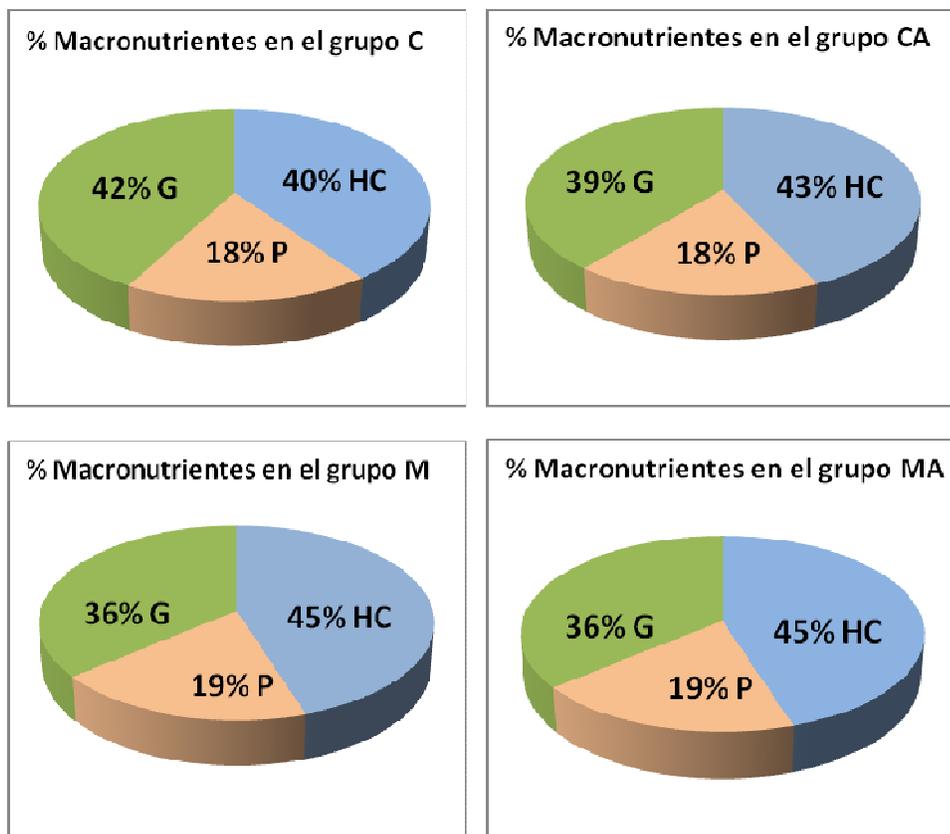


Figura 27. Ingesta de Macronutrientes en los grupos C, CA, M y MA. Los resultados están expresados en %

Para evaluar la distribución del consumo de lípidos (30-35%) en función de los ácidos grasos (saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) de las dietas de nuestras madres, se compararon nuestros valores observados con los recomendados por el programa utilizado (Alimentador) y se observó que no hubo diferencias significativas entre los grupos.

GRASAS % Kcal	Rango recomendado de ingesta	C (42%)	CA (39%)	M (36%)	MA (36%)
AGS	7-8%	13%	12%	12%	12%
AGM	15-20%	22%	21%	19%	20%
AGP	5-7%	7%	6%	5%	4%

Tabla 9. Distribución del consumo de grasas. Los resultados están expresados en %

2.2. MICRONUTRIENTES

En la tabla 10, están representados los valores medios de vitaminas y su correspondiente desviación estándar. Al comparar la ingesta media de vitaminas inter-grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Media diaria	C	CA	M	MA
Vit. A (µg)	772 ± 439,5	821,9 ± 350,4	768,5 ± 354,3	868 ± 335,9
Vit. D (µg)	3,2 ± 1,9	2,6 ± 2,3	2,2 ± 2,1	3,2 ± 1,9
Vit. E (mg)	7,1 ± 3	7,1 ± 2	7,3 ± 3,6	8,3 ± 2,6
Vit. B1 (µg)	2,3 ± 1,5	2,36 ± 1,1	2,7 ± 1,3	2,2 ± 0,9
Vit. B2 (µg)	2,1 ± 1	2,3 ± 1,1	2,7 ± 1,3	2,2 ± 0,9
Vit. B6 (mg)	2,1 ± 0,8	2,4 ± 0,9	2,4 ± 0,6	2,1 ± 0,7
Niacina (mg)	25,9 ± 12,4	29,2 ± 19,6	33,1 ± 11,7	26,7 ± 10,7
Ac. Fólico (µg)	372,2 ± 139,5	422,7 ± 193,5	466,1 ± 172,3	451,5 ± 144,5
Vit. B12 (µg)	15,2 ± 11,3	15,5 ± 9,3	19,8 ± 10,4	17 ± 9,6
Vit. C(mg)	114,5 ± 83	138,9 ± 134,7	134,4 ± 96,7	105,31 ± 82,8

Tabla 10. *Ingesta de vitaminas. Los resultados están expresados en media ± desviación estándar de 60 madres lactantes*

En la tabla 11, están representados los valores medios de minerales y su correspondiente desviación estándar. Al comparar la ingesta media de minerales inter-grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

Media diaria	C	CA	M	MA
Ca (mg)	723,3 ± 258,6	665 ± 239,5	888,5 ± 375,5	842 ± 181,9
P (mg)	1217,8 ± 332,2	1212 ± 272	1333 ± 351,2	1405,2 ± 205,4
K (mg)	2406,6 ± 626	2729,4 ± 728	2964,9 ± 733,3	3093,2 ± 681,4
Na (mg)	1748,1 ± 564,6	1663,3 ± 647,3	1875,9 ± 778	1771 ± 513,8
Fe (mg)	8,9 ± 1,8	7,3 ± 2,2	8,8 ± 3,4	10,5 ± 3,1
Zn (mg)	7,15 ± 1,7	6,07 ± 1,8	7,64 ± 2,2	7,64 ± 1,5
I (mcg)	129,2 ± 48,8	125,5 ± 64,2	192,3 ± 87,2	174,2 ± 70,4
Cu (mg)	0,3 ± 0,4	1 ± 1,9	0,2 ± 0,4	0,7 ± 0,4
Mg (mg)	231,3 ± 58,5	253,8 ± 68,9	252 ± 73,2	292 ± 67,7
Se (mg)	63 ± 16,3	64,5 ± 23,2	75,4 ± 23,8	80 ± 29

Tabla 11. *Ingesta de minerales. Los resultados están expresados en media ± desviación estándar de 60 madres lactantes*

En cuanto a la cantidad consumida de frutas y verduras (sin tener en cuenta el suplemento de arándanos) en los distintos grupos de madres, no se observaron diferencias significativas, siendo el promedio obtenido en el grupo control de 455 ± 57 g/día y en el grupo mastitis de 470 ± 68 g/día.

3. ANÁLISIS DE LA LECHE MATERNA

3.1. ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE MATERNA

3.1.1 Estudio del daño inducido a macromoléculas en la leche materna

Para analizar el daño oxidativo a proteínas se cuantificó el contenido en grupos carbonilo (CGC) y para lípidos la concentración de malondialdehído (MDA).

3.1.1.1 Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas (CGC)

a) Efecto de la mastitis sobre el CGC en leche

Se observa que el contenido en grupos carbonilo al inicio del estudio es significativamente superior en la leche de madres con mastitis, indicando un mayor daño oxidativo a proteínas. Sin embargo, tras 21 días de evolución no existen diferencias significativas en el contenido de CGC tal y como se observa en la figura 28.

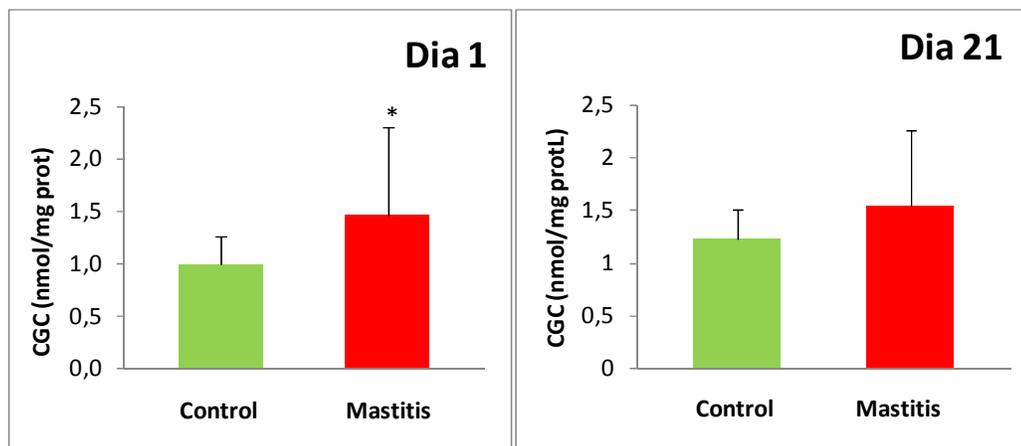


Figura 28. Efecto de la mastitis sobre el CGC en proteínas. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs Control

b) Efecto de la administración de arándanos sobre el CGC en leche

La variación en el CGC a lo largo del estudio no presenta diferencias significativas entre la leche de madres correspondientes a los distintos grupos, observando que la suplementación de la dieta con arándanos no tiene un efecto significativo sobre el CGC de la leche, tal y como se observa en la tabla 12 y figura 29.

CGC (nmol/mg prot)	Dia 1	Dia 21	Variable Cambio
C	0,96 ± 0,2	1,17 ± 0,33	0,25 ± 0,33
CA	1,03 ± 0,34	1,20 ± 0,22	0,17 ± 0,4
M	1,37 ± 1,20	1,31 ± 0,71	-0,15 ± 1,11
MA	1,24 ± 1,22	1,38 ± 1,99	-0,19 ± 1,32

Tabla 12. Contenido de grupos carbonilo en leche medido en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio, y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados en media ± desviación estándar

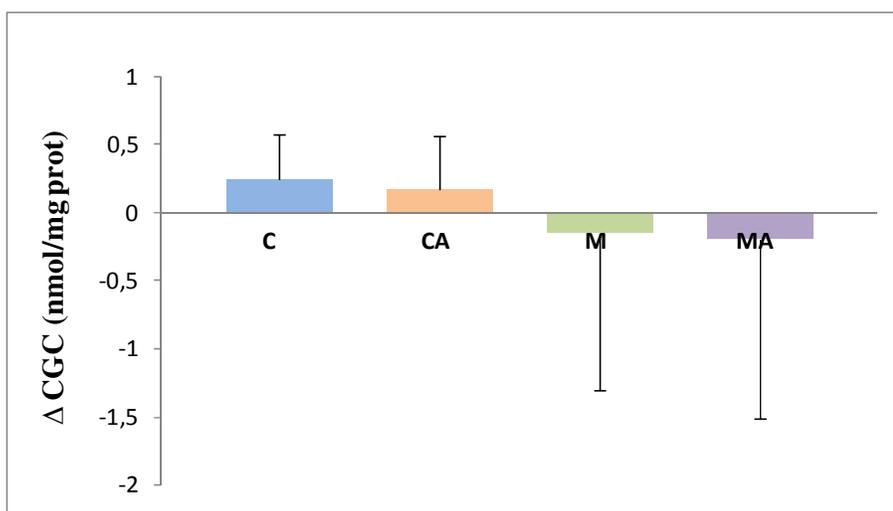


Figura 29. Variación del CGC en leche medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

3.1.1.2 Determinación de la concentración de MDA por HPLC

a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de MDA en leche

Contrariamente a lo observado con el daño oxidativo a proteínas, al inicio del estudio se observa que la concentración de MDA es menor en la leche de madres con mastitis cuando se compara frente a la del grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, tras 21 días de evolución no se observan diferencias estadísticamente significativas tal y como se observa en la figura 30.

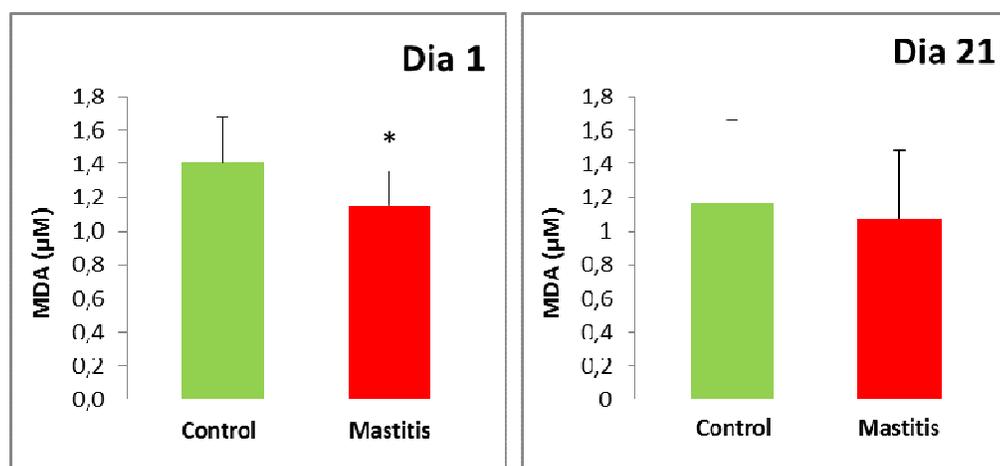


Figura 30. Efecto de la mastitis sobre la concentración de MDA. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs Control

b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de MDA en leche

El análisis estadístico muestra que la variación en la concentración de MDA en leche a lo largo de tiempo entre los distintos grupos de mujeres no es estadísticamente significativa. Por lo tanto, se considera que la suplementación de la dieta con arándanos no tiene un efecto significativo sobre la concentración de MDA de la leche de madres con mastitis o controles, tal y como se observa en la tabla 13 y figura 31.

MDA (μM)	Dia 1	Dia 21	Variable Cambio
C	$1,40 \pm 0,28$	$0,99 \pm 0,42$	$-0,3 \pm 0,37$
CA	$1,26 \pm 0,34$	$1,16 \pm 0,5$	$0,11 \pm 0,87$
M	$1,16 \pm 0,36$	$1,08 \pm 0,40$	$-0,01 \pm 0,44$
MA	$1,19 \pm 0,41$	$1,08 \pm 0,44$	$-0,12 \pm 0,42$

Tabla 13. Concentración de MDA en leche medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar

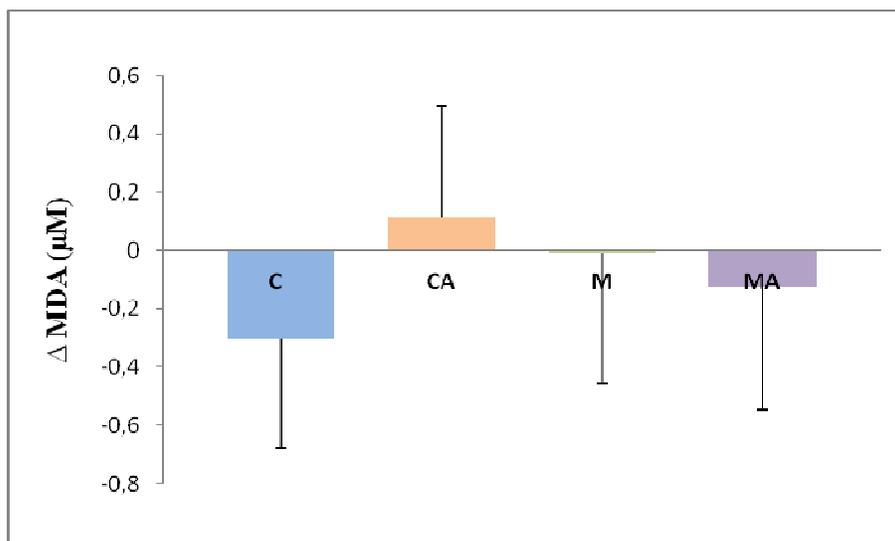


Figura 31. Variación de la concentración de MDA medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

3.1.2 Determinación de la capacidad antioxidante de la leche

➤ Determinación de la capacidad antioxidante total (CAT)

La capacidad antioxidante de la leche, se determinó por dos métodos diferentes: método del ABTS y método del FRAP.

3.1.2.1 Método del ABTS⁺⁺

a) Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método ABTS⁺⁺

Al inicio del estudio se observa que la CAT es significativamente mayor en la leche de madres con mastitis cuando se compara frente a la del grupo control. Sin embargo, tras 21 días el análisis de la leche muestra que la CAT es similar en ambos grupos tal y como se observa en la figura 32.

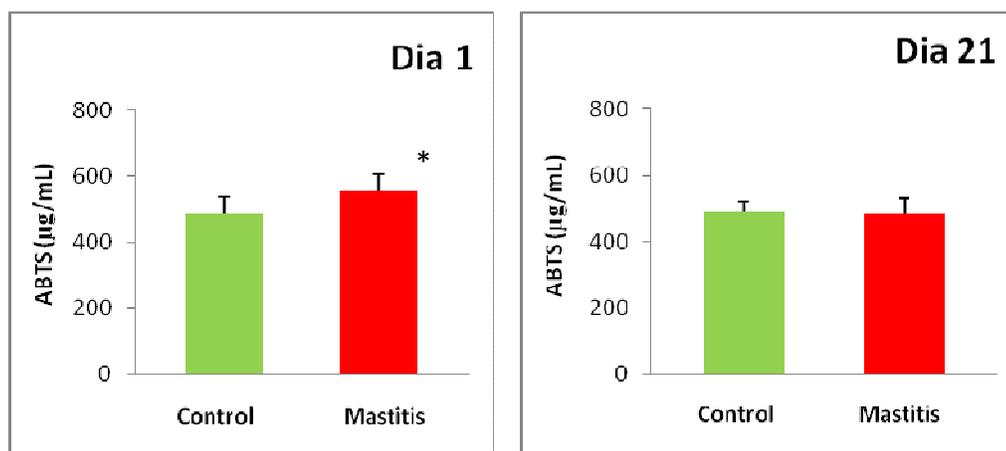


Figura 32. Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método ABTS⁺⁺. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs Control

b) Efecto de la administración de arándanos sobre la CAT por el método de ABTS⁺⁺

Se observa un aumento de la CAT en los grupos C y CA tras los 21 días de duración del estudio, así como una disminución en los grupos M y MA. El análisis estadístico muestra que los arándanos tienen un efecto significativo sobre variación de la CAT de la leche de madres con mastitis o controles tras 21 días de suplementación, tal y como se muestra en la tabla 14 y figura 33.

ABTS ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1	Dia 21	Variable Cambio
C	467,3 \pm 36,1	488,4 \pm 33,04	21,1 \pm 40
CA	502,6 \pm 53,7	538,8 \pm 52,7	36,2 \pm 24,72 [*]
M	577,38 \pm 42,7	484,5 \pm 46,7	-92,8 \pm 60,3 [◇]
MA	543,4 \pm 64,4	494,3 \pm 54,9	-49,1 \pm 43,8 [†]

Tabla 14. CAT medida con el método ABTS^{**} en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. ^{*} $p < 0,05$ vs M y MA, [◇] $p < 0,05$ vs resto de grupos, [†] $p < 0,05$ vs resto de grupos

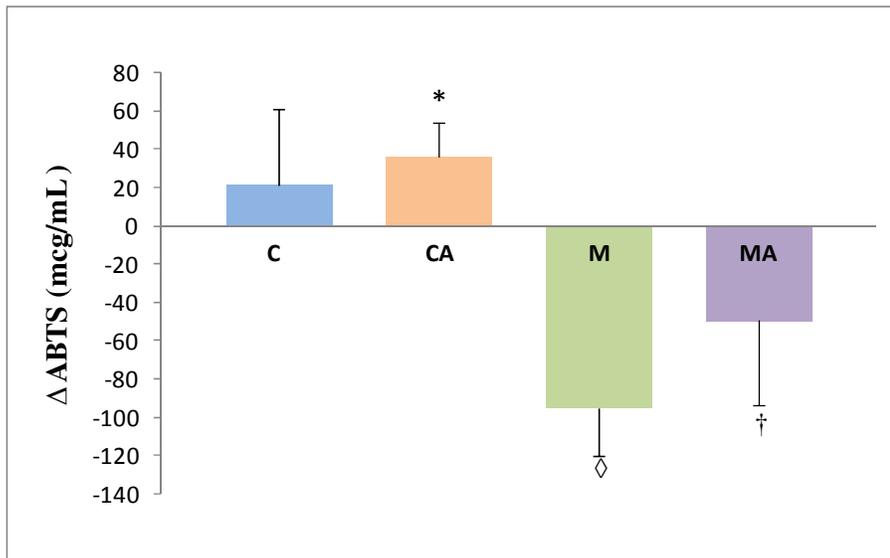


Figura 33. Variación de la CAT por el método de ABTS^{**} medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo ^{*} $p < 0,05$ vs M y MA, [◇] $p < 0,05$ vs resto de grupos, [†] $p < 0,05$ vs resto de grupos

3.1.2.2 Método del FRAP

a) Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método del FRAP

Al igual que ocurre con la CAT medida por ABTS•+, se observa que al inicio del estudio la CAT es mayor en la leche de madres con mastitis cuando se compara frente a la del grupo control. Sin embargo en este caso la diferencia no es estadísticamente significativa. Tras 21 días de evolución tampoco se observan diferencias estadísticamente significativas entre grupos, tal y como se observa en la figura 34.

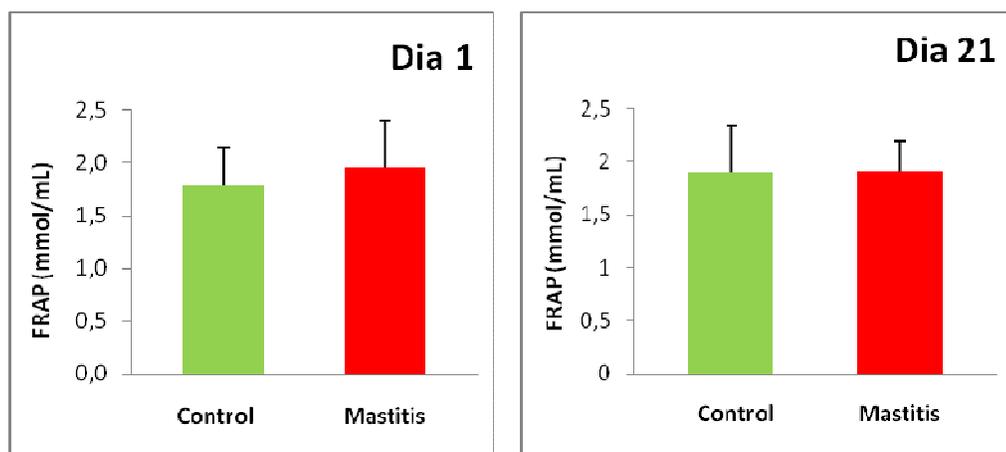


Figura 34. Efecto de la mastitis sobre la CAT con el método del FRAP. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar

b) Efecto de la administración de arándanos sobre la CAT por el método del FRAP

Al igual que ocurre con la CAT medida por el método ABTS•+, se observa una mayor disminución de la CAT en los grupos de madres con mastitis con, o sin arándanos en relación a la de los grupos control, y con una discreta mejora del grupo de arándanos en relación al de madres con mastitis que no consumen arándanos. Sin embargo, en este caso el análisis estadístico muestra que las

diferencias entre los grupos no son estadísticamente significativas (tabla 15 y figura 35).

FRAP (mmol/mL)	Día 1	Día 21	Variable Cambio
C	1,87 ± 0,47	1,89 ± 0,44	0,02 ± 0,6
CA	1,72 ± 0,28	1,92 ± 0,25	0,2 ± 0,34
M	1,94 ± 0,47	1,90 ± 0,28	-0,02 ± 0,49
MA	2,03 ± 0,33	1,86 ± 0,14	-0,27 ± 0,3

Tabla 15. CAT medida con el método FRAP en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados en media ± desviación estándar

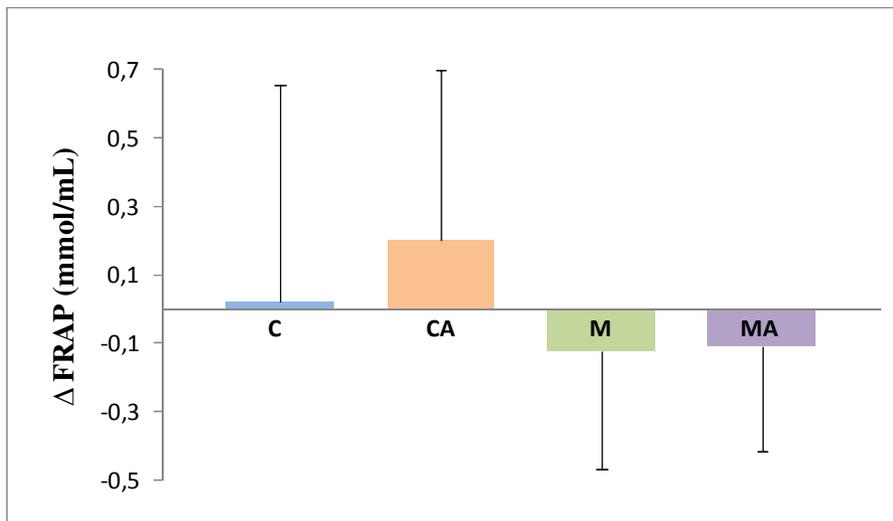


Figura 35. Variación de la CAT medida con el método FRAP en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

3.1.3 Determinación de la defensa antioxidante

Para la evaluación de la defensa antioxidante se determinaron: el contenido en polifenoles totales, el glutatión reducido (GSH) y la glutatión peroxidasa (GPx).

☐ Determinación del contenido en antioxidantes

3.1.3.1 Determinación de polifenoles totales en la leche (Método de Folin-Ciocalteu)

a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de polifenoles totales

Al inicio del estudio se observa que la concentración de polifenoles es mayor en la leche de madres con mastitis frente a la del grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Tras 21 días de evolución dejan de observarse estas diferencias estadísticamente significativas tal y como se observa en la figura 36.

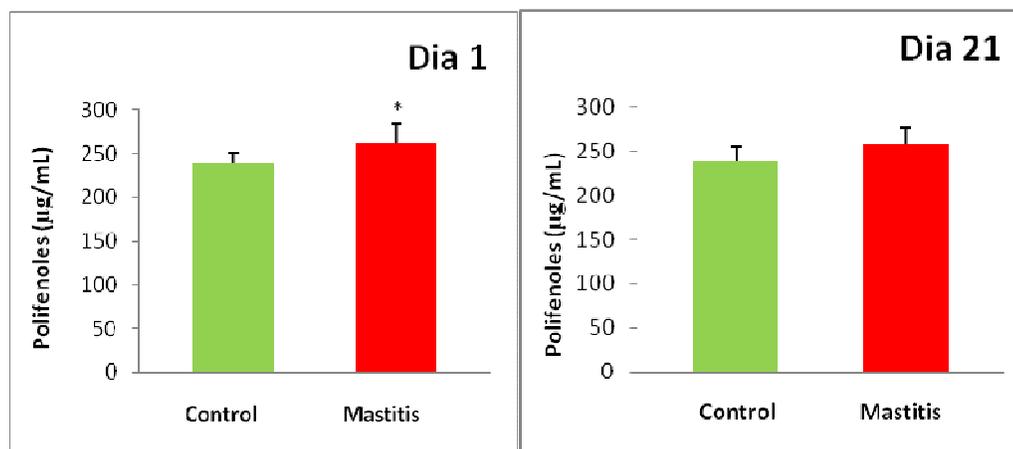


Figura 36. Efecto de la mastitis sobre la concentración de polifenoles totales. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs C.

b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de polifenoles totales

El análisis estadístico muestra que la suplementación de la dieta con arándanos tiene un efecto significativo sobre la concentración de polifenoles totales de la leche de madres con mastitis, incrementando su concentración tras 21 días de suplementación. El grupo control suplementado con arándanos también muestra un

incremento en la concentración de polifenoles tras 21 días, aunque la diferencia no sea estadísticamente significativa, tal y como se observa en la tabla 16 y figura 37.

PT ($\mu\text{g/mL}$)	Dia 1	Dia 21	Variable Cambio
C	238,2 \pm 11,9	238,8 \pm 15,9	0,62 \pm 13,88
CA	238,4 \pm 12,9	249,9 \pm 25,7	11,5 \pm 25,9
M	258,1 \pm 24,6	255,6 \pm 19,9	-1,24 \pm 20,12
MA	260,4 \pm 18,8	284,2 \pm 16,8	22,9 \pm 23,9 *

Tabla 16. Concentración de polifenoles totales medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs C y M

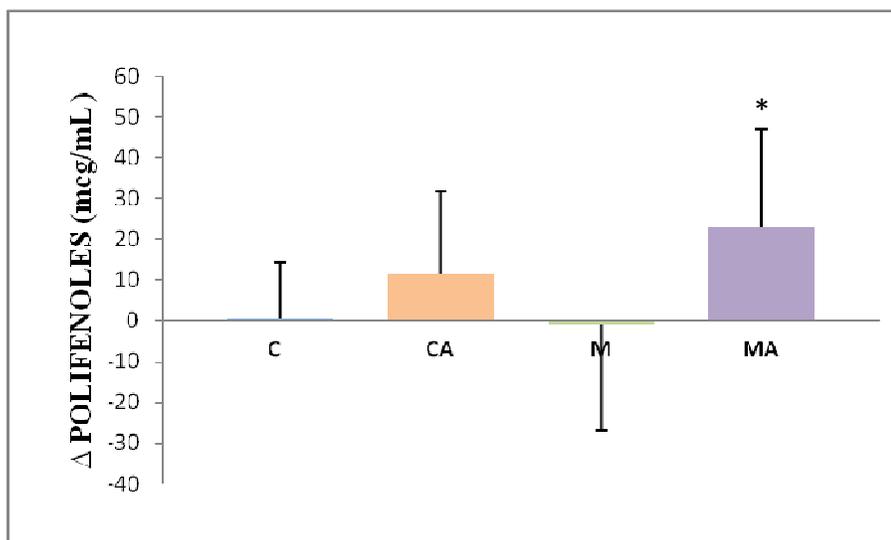


Figura 37. Variación de la concentración de polifenoles totales medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo * $p < 0,05$ vs C y M

3.1.3.2 Contenido en glutatión (GSH)

a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de GSH en la leche

Tanto al inicio del estudio como tras 21 días de evolución de la enfermedad, se observa que la concentración de GSH es menor en la leche de madres con mastitis cuando se compara frente a la del grupo control, sin embargo esta diferencia no es estadísticamente significativa, tal y como muestra la figura 38.

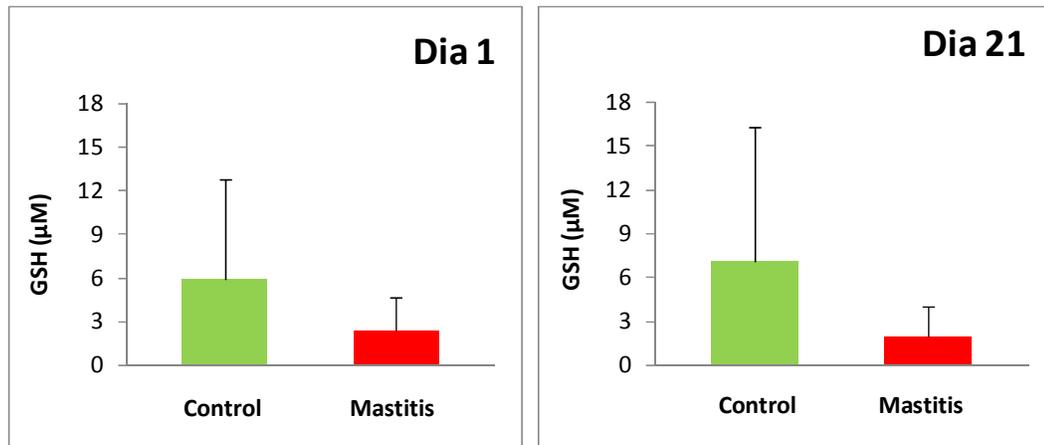


Figura 38. Efecto de la mastitis sobre la concentración de GSH. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar

b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de GSH en la leche

Se observa un aumento de la concentración de GSH en la leche de madres de los grupos C y CA, que no se aprecia en los grupos M y MA. Sin embargo, el análisis estadístico muestra que estas variaciones en la concentración de GSH a lo largo de tiempo entre los distintos grupos de mujeres no es estadísticamente significativa, y por lo tanto se considera que la suplementación de la dieta con arándanos no tiene un efecto significativo sobre este parámetro, tal y como se observa en la tabla 17 y figura 39.

GSH (μmol)	Día 1	Día 21	Variable Cambio
C	5,9 \pm 6,9	7,0 \pm 9,3	1,1 \pm 2,6
CA	3,3 \pm 1,2	3,4 \pm 1,9	0,19 \pm 0,63
M	2,4 \pm 2,2	1,9 \pm 2,0	-0,007 \pm 0,177
MA	3,7 \pm 2,5	3,2 \pm 2,3	0,01 \pm 2,02

Tabla 17. Concentración de GSH medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar

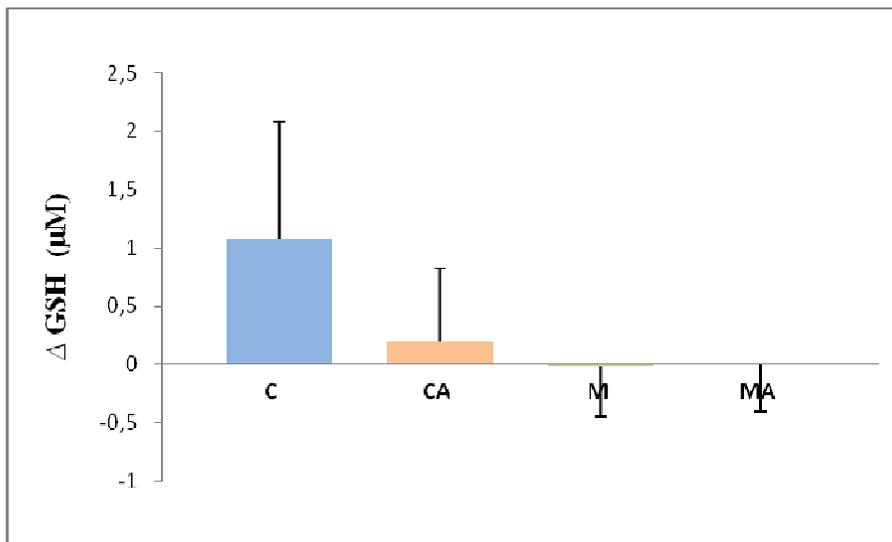


Figura 39.

Variación de la concentración de GSH medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

3.1.3.3 Actividad glutatión peroxidasa (GPx)

a) Efecto de la mastitis sobre la concentración de GPx en la leche

Al inicio del estudio se observa que la actividad GPx es mayor en la leche de madres con mastitis cuando se compara frente a la del grupo control, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. Sin embargo, tras 21 días de evolución ya no se observan dichas diferencias, tal y como se observa en la figura 40.

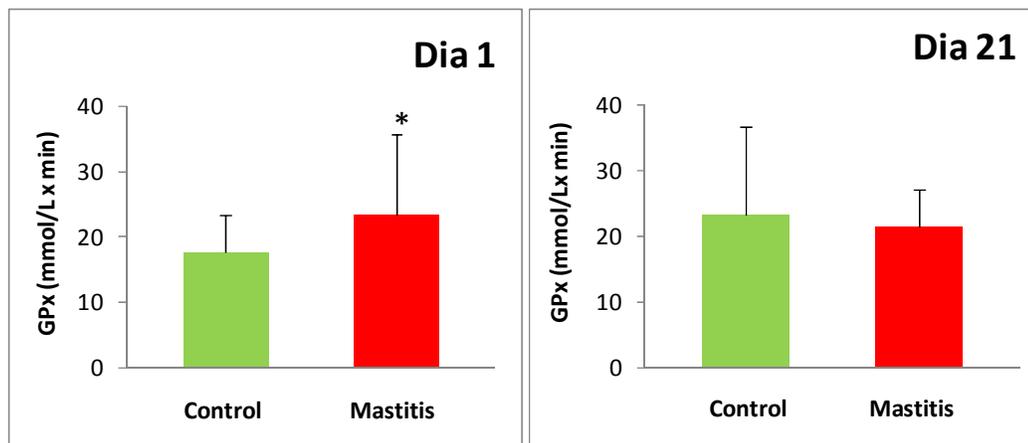


Figura 40. Efecto de la mastitis sobre la actividad GPx. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs C

b) Efecto de la administración de arándanos sobre la concentración de GPx en la leche

Tal como ocurre con la concentración de GSH, se observa un aumento de la actividad GPx en la leche de madres de los grupos C y CA, que no se aprecia en los grupos M y MA. Sin embargo, el análisis estadístico muestra que estas variaciones a lo largo de tiempo entre los distintos grupos de mujeres no son estadísticamente significativas, y por lo tanto se considera que la suplementación de la dieta con arándanos no tiene un efecto significativo sobre este parámetro, tal y como se observa en la tabla 18 y figura 41.

GPx ($\mu\text{mol/Lxmin}$)	Dia 1	Dia 21	Variable Cambio
C	17,6 \pm 5,8	23,2 \pm 13,5	6,4 \pm 19,8
CA	18,5 \pm 6,6	26,9 \pm 11,5	9,2 \pm 4,1
M	23,4 \pm 12,5	21,5 \pm 5,7	0,37 \pm 11,5
MA	29,2 \pm 18,0	24,1 \pm 13,5	-5,8 \pm 18,7

Tabla 18. Actividad de la GPx medida en los distintos grupos de madres al inicio y final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar

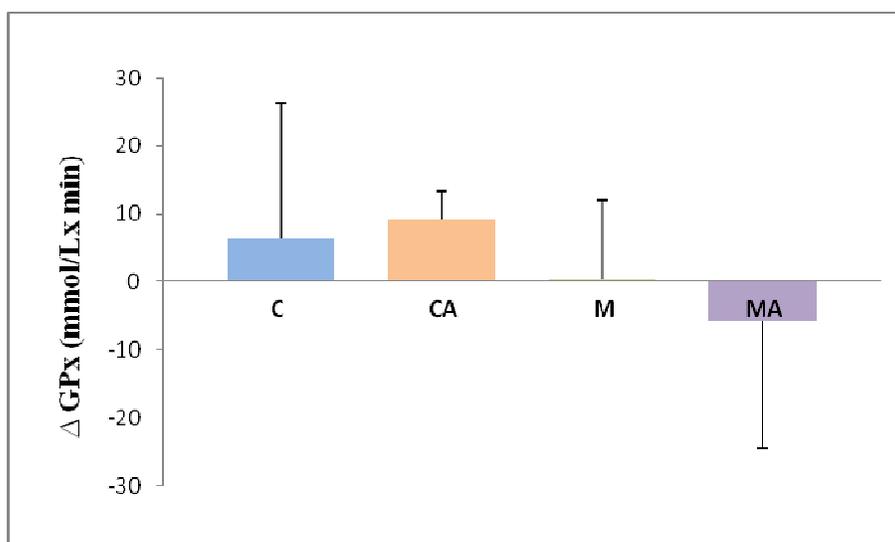


Figura 41. Variación de la actividad GPx medida en los distintos grupos de madres a lo largo del tiempo

VI. Discusión

El objetivo principal del presente trabajo es estudiar si el suplementar con arándanos la dieta de madres con mastitis tiene algún efecto sobre el estado oxidativo de su leche. Para ello, por un lado, hemos valorado el estado nutricional de las madres analizando la composición en macro y micronutrientes de sus dietas, y por otro lado, hemos comparado el estado oxidativo (en términos de daño a macromoléculas, capacidad antioxidante total y contenido en antioxidantes) de su leche tanto en las madres sanas como en madres con mastitis al inicio y al final del estudio una vez finalizada la suplementación dietética con arándanos.

1. VALORACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL DE LAS MADRES

El promedio de edad de las participantes fue entre 33 y 37 años. La somatometría de las madres no objetivó diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados. El IMC medio en todos los grupos está dentro del intervalo de normopeso (Tabla 6).

Para obtener información sobre el consumo dietético de las mujeres en todos los grupos se utilizaron registros de 24 horas durante un periodo de 3 días, técnica avalada por otros estudios (Otten, 2006; Shim, 2014;) Por tanto, la metodología aplicada para analizar la ingesta de alimentos en nuestro estudio es la adecuada.

Respecto a la ingesta de macro y micronutrientes entre los distintos grupos de estudio no hubo diferencias significativas (Tabla 7, 10 y 11). Sin embargo, contrariamente a lo que esperábamos, y tras comparar la ingesta de macronutrientes observada en las madres con las ingestas recomendadas, la dieta de las mujeres estudiadas en todos los grupos era desequilibrada en lo que respecta al aporte de estos nutrientes, con un exceso de ingesta de grasas y proteínas en detrimento de la ingesta de hidratos de carbono (Tabla 8 y figura 27) (Bolton & Woodward, 1994; Astrup & Raben, 1995; Fernández-Vergel et al., 2006; Quiles, 2006; Codoñer-Franch et al., 2013; Varela-Moreiras et al., 2013).

La ingesta calórica media de nuestras mujeres se situó en 1600 Kcal/día aproximadamente. Este valor se encuentra por debajo de la ingesta calórica recomendada por el programa Alimentador, que se sitúa en 2562 Kcal/día. Sin embargo, nuestros resultados están en concordancia con estudios realizados en población femenina por Varela y colaboradores que estudiaron el consumo medio de mujeres adultas con edades comprendidas entre 18 y 63 años, obteniendo como resultado un promedio de 1675 Kcal/día (Ruiz et al., 2015).

En relación a otros estudios realizados en madres lactantes, aunque no existen muchos datos en la literatura sobre la dieta en este tipo de población, hemos encontrado algunos estudios realizados en países con hábitos dietéticos diferentes al nuestro (Chen et al., 2012; Hailessie et al., 2013). Sin embargo las comparaciones se han realizado en estudios de población española con criterios de inclusión similares a los de este trabajo. En concreto, hemos tenido en cuenta principalmente los resultados de Quiles y Codoñer-Franch, en los que se obtienen aportes calóricos superiores (2446 kcal/día (Quiles, 2006) y 2094 Kcal/día (Codoñer-Franch et al., 2013), aunque también se encuentren por debajo de las recomendaciones. Es importante destacar en este sentido, que existen estudios que indican que ingestas inferiores a 1500Kcal/día pueden producir disminución del volumen de leche (Ares et al., 2016).

Los resultados del análisis de la ingesta de macronutrientes en nuestro estudio, mostraron que todos los grupos de madres tuvieron un consumo de proteínas entre el 18% y 19%. Nuestros resultados están en rango con el trabajo de Quiles (17%) y el de Codoñer-Franch y cols. (18%) realizados en madres lactantes (Quiles, 2006; Codoñer-Franch et al., 2013). Tanto el consumo de proteínas de nuestras madres como el de las madres participantes en los otros dos estudios está muy por encima de lo recomendado (10-12%), siguiendo el patrón de las sociedades desarrolladas.

Con respecto a los hidratos de carbono (HC), en nuestros grupos la media se situó alrededor del 43%, ligeramente inferior a los consumos descritos por Quiles (45%) y Codoñer-Franch y cols. (46%). Estos resultados quedan por debajo de la ingesta recomendada de HC (50-55%). Este bajo consumo de carbohidratos y

especialmente de carbohidratos complejos frente a azúcares sencillos ya ha sido descrito por otros autores para la población en general (Varela-Moreiras et al., 2013).

Respecto al aporte de grasas, el consumo medio de nuestros grupos (38%) estuvo por encima del 30-35% recomendado como saludable tanto por el programa utilizado (Alimentador) como por la mayoría de sociedades nacionales e internacionales y algunos científicos (FESNAD, 2010; National Academy of Sciences, 2006; Silvestre, 2013). De hecho, todos los grupos tomaban una dieta desequilibrada. Este desequilibrio fue algo mayor en los grupos C y CA (mayor porcentaje de grasa y menor en hidratos de carbono) pero las diferencias entre grupos no fueron significativas. El consumo medio de grasas en nuestros grupos coincide con el descrito por Quiles (38%) y Codoñer-Franch y cols. (36%) (Quiles, 2006; Codoñer-Franch et al., 2013). Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA, 2010), considera que no existen suficientes datos para definir un nivel inferior o superior recomendados de consumo de grasa aunque algunos grupos han propuesto un nivel inferior del 20% y superior del 35% similares a las recomendaciones americanas (Otten, 2006), de la OMS (OMS, 2004) y de la FAO (FAO, 2010).

En cuanto al consumo medio de ácidos grasos observamos un exceso de ácidos grasos saturados (AGS) (12%), en detrimento del consumo de ácidos grasos poliinsaturados (AGP) (5%) (procedentes fundamentalmente de pescado azul y frutos secos) entre las mujeres estudiadas en nuestro trabajo (Tabla 9). Este comportamiento es muy similar a los resultados obtenidos en los estudios realizados por Quiles y Codoñer-Franch (Quiles, 2006; Codoñer-Franch et al., 2013). Debemos de tener presente que la grasa poliinsaturada es un componente fundamental de la leche materna (Yahvah, 2015; Delplanque, 2015). Este incremento en los AGS puede ser debido entre otros factores al cambio del estilo de vida en las sociedades desarrolladas. De hecho, este patrón dietético es el que se produce con más frecuencia en las dietas actuales de los países desarrollados. Esta situación, ya ha sido descrita por otros autores (Fernández-Vergel et al., 2006; Serra-Majem, 2007;

García-Arenzana, 2011) y parece reflejar el abandono progresivo, en las últimas décadas, en nuestra población de los buenos hábitos alimentarios, con un alejamiento de la dieta mediterránea. (Varela-Moreiras, 2013). Aunque estos autores definen este efecto para una población general, podría hacerse extensible a la población de estudio del presente trabajo.

Por otra parte, al analizar el consumo de frutas y verduras en los distintos grupos de madres (sin tener en cuenta el suplemento de arándanos), no hubo diferencias significativas, por lo que nuestros resultados no se ven influenciados por una diferente ingesta de antioxidantes dietéticos. Tanto el grupo control ($455 \pm 57\text{g/día}$) como el grupo mastitis ($470 \pm 68 \text{g/día}$) se encuentran dentro del consumo de futas y verduras recomendado por la OMS (400g/día) (OMS, 2004).

En cuanto a los resultados del análisis de la ingesta de micronutrientes de nuestras participantes, y en concreto cuando analizamos la ingesta de vitaminas, se observa que los cuatro grupos de estudio presentan valores inferiores a la ingesta diaria recomendada, en los que cabe destacar, la ingesta de ácido fólico y vitaminas A, D y E (Durham et al., 2011). En los estudios de Quiles y Codoñer-Franch, se observa también una ingesta de vitaminas A y E inferior a la recomendada. Actualmente, este hecho quedaría paliado por la práctica habitual de suplementar la dieta de la mujer embarazada y lactante con suplementos vitamínicos y especialmente con Ácido Fólico (Pcciano & McGuire, 2009; Lamers, 2011; Pallás et al., 2014; Ares et al., 2016).

Por el contrario, en nuestro estudio se observa una ingesta de vitamina C superior a la dosis diaria recomendada en todos los grupos de madres. Esto podría haber enmascarado los resultados y no observar la efectividad de los arándanos. Sin embargo, Hoppu ha descrito que para la vitamina C, el contenido en leche no aumenta a partir de un determinado nivel umbral, aunque aumente la ingesta (Hoppu, 2005). Por tanto, teniendo en cuenta, por un lado este efecto umbral de la vitamina C y por otro lado, que las mujeres que han participado en el estudio viven en una zona en la que es especialmente frecuente el consumo de cítricos ricos en

vitamina C (Comunidad Valenciana), consideramos que muy probablemente, esta ingesta haya tenido poca influencia en los resultados de nuestro estudio.

Al analizar la ingesta de los minerales, se observa en general, que esta es inferior a la recomendada en todos los grupos de madres. Algunos autores ya han alertado sobre el riesgo de aportes insuficientes en la dieta habitual de las mujeres lactantes para algunos micronutrientes como las vitaminas A, B y D y minerales como el hierro (Fe), el calcio (Ca) o el yodo (I) (Allen, 2005).

Las necesidades nutricionales de la mujer lactante continúan con muchos interrogantes (Berti, 2014). La OMS recomienda durante la gestación y la lactancia, estados vulnerables para la mujer, un control de la ingesta de alimentos y el estado nutricional, seguimiento que en la práctica no se lleva a cabo (OMS, 2015).

Estos hechos, invitan a la reflexión y, a pesar de que el tamaño y el tipo de muestra de nuestro estudio no permiten sacar conclusiones generalizadas, si deberían alertar sobre la necesidad de valorar y asesorar adecuadamente a las mujeres sobre su dieta en esta etapa de su vida.

2. VALORACIÓN DEL ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE MATERNA

2.1 ESTUDIO DEL DAÑO INDUCIDO A MACROMOLECULAS EN LECHE MATERNA

2.1.1 Determinación del contenido de CGC en proteínas

La determinación de los niveles de grupos carbonilo (CGC) está reconocido como un buen marcador de daño oxidativo a proteínas (Berlett & Stadtman, 1997).

El contenido de CGC en las muestras de leche de nuestro estudio se encuentra en el mismo rango obtenido por otros autores (Codoñer & Valls, 2011; Codoñer-Franch et al., 2013; Castillo-Castañeda et al., 2017). Sin embargo, al analizar los resultados del CGC en la leche a día 1 se observa que hay más daño a proteínas en la leche de madres con mastitis, ya que el CGC es significativamente mayor en este

grupo que en los controles (Figura 28). Sin embargo, a día 21, se observa que la situación tiende a normalizarse, dado que dejan de observarse diferencias estadísticamente significativas en el CGC de leche de madres con mastitis frente a los controles.

En la actualidad no existen estudios científicos que describan el daño oxidativo a proteínas en leche inducido por mastitis. Sin embargo, sí se ha estudiado el efecto de la suplementación de la dieta de madres lactantes con antioxidantes, observándose una disminución en el CGC de la leche (Codoñer-Franch et al., 2013).

2.1.2 Determinación de la concentración de MDA en leche

El MDA es el principal producto de la peroxidación lipídica, siendo el incremento de su concentración indicativo de una posible situación de estrés oxidativo (Halliwell, 2000). Dado que el MDA se produce debido a una alteración en la composición lipídica, el estudio de las variaciones en su concentración podrían ser útiles para conocer el grado de alteración de la fracción lipídica de la leche materna. En este estudio la concentración de MDA se ha determinado mediante HPLC dado que se sabe que esta técnica es la más adecuada para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica (Esterbauer H. et al., 1991).

Al igual que ocurre con el CGC, las concentraciones de MDA en las muestras de leche de nuestro estudio son similares a las descritas en estudios previos (Miranda et al., 2004, 2011; Silvestre et al., 2008, 2010; Codoñer & Valls, 2011; Codoñer-Franch, 2013). Por otro lado, se ha demostrado que los tratamientos térmicos de la leche inducen un incremento de la peroxidación lipídica (Miranda et al., 2004, 2011; Silvestre et al., 2010). En concreto, en relación al almacenamiento en frío, se ha puesto de manifiesto que cuando la leche es almacenada a -80°C por periodos superiores a 30 días aumenta la concentración de MDA significativamente con respecto a la concentración observada en leche fresca (Silvestre et al., 2010). Por ello en nuestro estudio todas las muestras fueron procesadas antes de transcurrir 30 días desde su recogida y almacenamiento a -80°C , para garantizar que la

congelación no afectara a la concentración de MDA y sus posibles diferencias entre los distintos grupos.

Así, al estudiar la concentración de MDA, y contrariamente a lo observado en el daño a proteínas, sorprende observar que la leche de las madres con mastitis a día 1 tiene menor grado de peroxidación lipídica que la leche de las madres sanas (Figura 30). No existen estudios de la concentración de MDA en leche de madres con mastitis. Sin embargo, sí se ha descrito un aumento de la concentración de MDA en la leche de otras especies animales con mastitis (Li-Li & Qingzhang, 2009; El-Deeb, 2013; Eslami et al., 2015). Es destacable, que tras 21 días de evolución de la enfermedad, ya no se observan diferencias estadísticamente significativas en la concentración de MDA en leche entre los grupos mastitis y control.

Por otro lado, cuando se estudia la variación del CGC y la concentración de MDA a lo largo del tiempo, se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre los distintos grupos, y por tanto no se puede afirmar que los arándanos tengan un efecto sobre el daño oxidativo a proteínas y lípidos en leche (Tablas 12 y 13; y figuras 29 y 31). A día de hoy, no tenemos estudios en los que se analice la suplementación de antioxidantes en madres con mastitis para poder comparar nuestros resultados. Si los hay en madres sanas suplementadas con cerveza sin alcohol, en los que se observa una disminución de la concentración de MDA en el plasma de las madres y en la orina de los lactantes (Codoñer & Valls, 2011; Codoñer-Franch et al., 2013).

Sorprende también, que sabiendo que los lípidos son más sensibles al daño oxidativo que las proteínas, en nuestros resultados encontramos una disminución de la peroxidación lipídica en madres con mastitis junto a un aumento del daño oxidativo a proteínas. Sin embargo, en un estudio realizado recientemente (Birgul S et al., 2016), en el que se analiza el contenido de macronutrientes en la leche de madres con mastitis, se observa que hay una considerable disminución del contenido en lípidos e hidratos de carbono frente al observado en los controles. Aunque en este estudio no se observaron diferencias significativas en el contenido de proteínas, estos resultados podrían implicar que el porcentaje de proteínas con

respecto al aporte calórico total de macronutrientes en la leche de madres con mastitis aumenta notablemente, al haber menos lípidos e HC. Esta situación podría justificar que se aprecie un daño a proteínas y una menor peroxidación lipídica a pesar de que los lípidos sean más sensibles al daño oxidativo.

2.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE

➤ **Determinación de la capacidad antioxidante total (cat)**

La medida de la capacidad antioxidante total (CAT) nos permite conocer la capacidad de la leche materna para controlar el desequilibrio REDOX. Este parámetro no solo recoge la suma de actividades de los diversos antioxidantes conocidos, sino también de los desconocidos y de las interacciones entre todos ellos. La capacidad antioxidante de una mezcla no viene dada solo por la suma de las capacidades antioxidantes de cada uno de sus componentes; también depende del microambiente en que se encuentra el compuesto, y los compuestos interactúan entre sí pudiendo producirse efectos sinérgicos o inhibitorios. Por eso la medición de la capacidad antioxidante se ha descrito como un indicador sensible que permite detectar pequeñas diferencias mucho mejor que las mediciones de los antioxidantes por separado, permitiendo tener en cuenta las interacciones entre ellos (Turoli, 2004; Cloetens et al., 2013; Cekiç et al., 2015).

Existen varios métodos para determinar la capacidad antioxidante total en muestras biológicas (Prior & Cao, 1999; Ghiselli et al., 2000). Cada método mide la capacidad antioxidante de compuestos bioactivos diferentes con capacidades antioxidantes variables, unos miden la capacidad de donar electrones a un determinado RL, otros la habilidad para detener algún tipo de fuente de inicio de oxidación, la quelación de un metal de transición o la absorción de radiación ultravioleta. No es extraño que los resultados obtenidos para una misma muestra mediante distintas técnicas puedan por tanto ser diferentes ya que determinan acciones antioxidantes diversas.

La leche humana es rica en distintos compuestos antioxidantes con capacidad para interactuar entre sí (Silvestre et al., 2008; Yao et al., 2010; Hanson et al., 2016), y por tanto es de esperar que distintos métodos puedan obtener resultados variables, algo que de hecho ya ha sido descrito en la literatura con anterioridad (Janaszewska, 2002; Cekiç et al., 2015). Todo esto nos llevó a utilizar dos métodos que han sido ampliamente utilizados por otros científicos para determinar la capacidad antioxidante de la leche humana.

2.2.1 Método ABTS^{•+}

El método ABTS^{•+} mide la capacidad de la leche de donar electrones a un radical libre (ABTS^{•+}) y permite medir la actividad de compuestos de naturaleza hidrofílica y lipofílica incluyendo flavonoides, hydroxicinamatos y carotenoides (Re et al., 1999). Por otro lado tiene el inconveniente de obtener valores con rangos muy estrechos, lo que limita el análisis estadístico especialmente cuando el tamaño muestral no es grande (Ezaki, 2007). Al analizar los resultados obtenidos sobre la capacidad antioxidante de la leche por el método ABTS^{•+}, se observa que en el estadio inicial (día 1), la CAT es significativamente mayor en las madres con mastitis (Figura 32). Aunque nuestros resultados no encajan con los descritos en otros estudios en los que se observa una disminución de la CAT en leche de otras especies animales con mastitis (Atakisi et al., 2010; Silanikove et al., 2014), podría ser debido a que en estos estudios no se repitieron los muestreos a lo largo del tiempo y la recogida de muestras pudo hacerse en un estadio distinto de la patología.

El incremento en la CAT que observamos en nuestro estudio puede ser debido, al igual que se ha descrito en otras patologías a un mecanismo fisiolopatológico compensatorio, consistente en una mayor producción de antioxidantes como mecanismo de defensa para defenderse de ese insulto oxidativo (Chevari et al., 1992; González-Párraga et al., 2003). Este mecanismo decaería con el tiempo, de tal forma que es esperable que a día 21, la situación se normalice.

Cuando analizamos la variación de la CAT a lo largo del tiempo (Tabla 14 y figura 33), se observa que la CAT disminuye tanto en el grupo Mastitis (M) como en el grupo Mastitis con arándanos (MA), siendo esto estadísticamente significativo con el resto de grupos. Esta disminución está atenuada en el grupo MA, por lo que podemos decir que el grupo suplementado con arándanos pierde menos capacidad antioxidante que el grupo sin suplementar, de ahí que podamos concluir que los arándanos tiene un efecto sobre la capacidad antioxidante de la leche de madres con mastitis. Estos resultados están en consonancia con los descritos en otros estudios realizados con animales, como el de Dimri y cols., en el que se observa que un suplemento con vitaminas A y E en búfalos con mastitis es capaz de atenuar la disminución de la CAT en leche (Dimri et al., 2013). Aunque a día de hoy no existe ningún estudio sobre la CAT en leche humana de madres con mastitis con o sin suplementos con antioxidantes, sí existen numerosos trabajos que han observado una disminución de la CAT de la leche materna a lo largo del tiempo, (Quiles, 2006; Ezaki, 2008; Mataix, 2008; Li, 2009; Zarban, 2009; Codoñer-Franch et al., 2013; Nykniaz, 2013).

Si nos fijamos en los grupos C y CA (Tabla 14 y figura 33), vemos que aunque estos grupos mejoran su capacidad antioxidante tras la administración de los arándanos, el análisis estadístico nos dice que la mejoría de CA es estadísticamente significativa respecto a los grupos M y MA; y no frente al grupo Control; por lo que no podemos concluir que los arándanos mejoren la capacidad antioxidante de la leche de madres sanas. Sin embargo, en un estudio realizado en madres lactantes a las que se les suplementó con cerveza sin alcohol, rica en antioxidantes, si se observa que la caída en la actividad antioxidante es menor en la leche de las madres que habían sido suplementadas con cerveza (Valls & Codoñer, 2011; Codoñer-Franch, 2013).

2.2.2 Método FRAP

El FRAP mide especialmente bien la actividad antioxidante de compuestos como el ácido ascórbico, el alfa tocoferol, el ácido úrico, la bilirrubina y los compuestos fenólicos pero no la de proteínas, glutatión o ácido lipóico (Benzie, 1999) y se ha utilizado anteriormente para medir la capacidad antioxidante total de muestras de leche humana (Oveisi et al., 2010).

Al analizar los resultados obtenidos sobre la capacidad antioxidante de la leche determinada con el método FRAP, se observa el mismo comportamiento que con el método ABTS^{•+}, aunque en este caso las diferencias no son estadísticamente significativas.

Con todo esto, nuestros resultados constatan que la leche humana tiene un importante contenido de antioxidantes y una capacidad antioxidante total que es el resultado no sólo de la concentración de antioxidantes sino de las interacciones entre los mismos. Es muy probable que la función de todo este contenido antioxidante esté dirigido a la protección antioxidante del neonato cuyas defensas en este aspecto son todavía inmaduras, incluso en el recién nacido a término sano.

2.3 DETERMINACIÓN DE LA DEFENSA ANTIOXIDANTE DE LA LECHE

Tal y como se ha mencionado anteriormente, la leche humana posee una elevada capacidad antioxidante y contiene sustancias antioxidantes que no aporta ningún otro alimento en ninguna otra época de la vida y tienen la misión de ayudar a proteger el estado oxidativo del neonato (Ankrah et al., 2000; L'Abbe & Friel, 2000; VanderJagt et al., 2001; Hanna et al., 2004). Aunque se ha explicado anteriormente la importancia de estudiar la CAT, también consideramos relevante determinar el contenido de algunos de los antioxidantes más importantes de la leche.

2.3.1 Determinación de la concentración de polifenoles totales

Al analizar los resultados obtenidos sobre el contenido de polifenoles totales, se observa que al inicio del estudio (día 1), su contenido es significativamente mayor en las madres con mastitis (Figura 36). Este aumento de polifenoles parece estar contribuyendo al aumento de la CAT observado en la leche de madres con mastitis (Figuras 32 y 34) y, al igual que se ha explicado en el apartado de la determinación de la CAT, podría ser debido, a un mecanismo fisiopatológico compensatorio, consistente en una mayor producción de antioxidantes para defenderse del estrés oxidativo inducido por la mastitis (Chevari et al., 1992; González-Párraga et al., 2003). De nuevo, al igual que ocurre con la CAT, a día 21, la situación se normaliza.

A pesar del interés creciente sobre el estudio del contenido en polifenoles de distintos alimentos debido a su importancia en múltiples procesos biológicos al poseer propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, de inhibición de la agregación plaquetaria, inmunológicas e incluso de protección del ADN (Babbar et al., 2015), en la actualidad existen pocos datos en la literatura sobre su concentración en la leche humana. Así, algunos autores han demostrado la presencia en leche de isoflavonas tras el consumo materno de leche de soja o tofu (Frankie et al., 2006). Li y cols. también determinaron el contenido en polifenoles en 6 muestras de leche materna con el objeto de comparar el aroma de la leche materna con el de las leches de fórmula (Li et al., 2009), y Vázquez determinó el contenido en polifenoles en la leche de diferentes especies (vacas, cabras, ovejas y leche humana) con el objetivo de validar una nueva técnica de extracción (Vázquez et al., 2015). Otro estudio reciente confirmó el contenido de diversos flavonoides (epicatequina, naringenina, kaempferol, hesperitina y quercetina) y varios carotenoides (α -caroteno, β -caroteno, licopeno) en la leche de 17 mujeres, madres de recién nacidos a término. En cuanto a los flavonoides, no se observaron variaciones en sus concentraciones en la leche a lo largo del primer mes a excepción del kaempferol, y en cuanto a los carotenoides se observó que su concentración disminuía a medida que avanzaba la lactancia. No obstante estos autores no estudiaron el contenido total en polifenoles, ni tampoco la correlación de estos con la dieta materna (Song et al., 2013).

En nuestro trabajo, cuando analizamos la variación del contenido en polifenoles a lo largo del tiempo (Tabla 16 y figura 37), aunque se aprecia que en el grupo CA el contenido en polifenoles aumenta a lo largo del estudio, esta diferencia no es estadísticamente significativa frente a la leche de las madres sanas que no consumieron arándanos. Por lo que no podemos afirmar que este fruto mejore el contenido en polifenoles de la leche de las madres sanas. Sin embargo, es muy importante destacar que el contenido en polifenoles en la leche del grupo de madres con mastitis que consumieron arándanos (MA) sí que incrementaron significativamente su contenido en polifenoles con respecto a la de las madres con mastitis que no consumieron arándanos (M), incluso con respecto a la leche de madres sanas que no consumieron arándanos (C). Es muy posible que el efecto diferencial de los arándanos sobre la evolución del contenido en polifenoles de la leche de madres CA y MA se deba a una cuestión de tamaño muestral, unida al hecho de que se observa una ligera disminución del contenido en polifenoles a lo largo del tiempo en la leche de madres con mastitis (M) que no se observa en el grupo control (C), aunque no llegue a ser estadísticamente significativa (Figura 37).

Destacar también que a día de hoy no podemos comparar nuestros datos con los de otros trabajos, porque no hay estudios en los que se determine el contenido total de polifenoles en leche con mastitis. De hecho, el nuestro es el primer trabajo en estudiar no sólo el contenido en polifenoles de la leche con mastitis, sino su evolución a lo largo del tiempo y el efecto del consumo de algún suplemento rico en antioxidantes como son los arándanos. Si se ha estudiado, el contenido de polifenoles en la leche de madres sanas suplementadas con cerveza sin alcohol, y en este caso se observó que el contenido en polifenoles disminuyó desde la fase de calostro a leche madura (Codoñer-Franch, 2013).

A pesar de que no hay ningún trabajo ni en humanos ni en animales que estudie el contenido de polifenoles en leche con mastitis, sí que se ha demostrado que los polifenoles son capaces de mejorar el proceso inflamatorio de las mastitis, de hecho hay un estudio realizado en ratas en el que se pone de manifiesto que el ácido clorogénico (un polifenol frecuente en la dieta habitual) es capaz de inhibir la

vía de señalización de NF- κ B mediada por TLR4, que parece ser la encargada de activar la producción de citocinas inflamatorias como la IL-6, IL-8 o TNF- α (Ruifeng et al., 2014). Con estos antecedentes, y teniendo en cuenta que nuestros resultados indican que los arándanos mejoran el estado oxidativo de la leche de madres con mastitis (al incrementar el contenido en polifenoles, y atenuar la pérdida de CAT), los arándanos podrían empezar a valorarse como posible tratamiento coadyuvante en madres con esta patología.

2.3.2 Estudio del sistema glutatión

Nuestros resultados confirman la presencia, en todas las muestras analizadas, de componentes protectores naturales en la leche materna con propiedades antioxidantes como el GSH o la GPx. Entre las propiedades antioxidantes de estos compuestos cabe destacar que forman parte de un importante sistema protector frente a la peroxidación lipídica (Van Vleet et al., 1981). Además, los resultados obtenidos para la concentración de GSH y actividad GPx se encuentran en el rango de los publicados anteriormente en muestras de leche humana (Miranda et al., 2004; Silvestre et al., 2008; Silvestre et al., 2010). Teniendo en cuenta por otro lado que se ha descrito que la congelación puede afectar a la actividad GPx, tal y como ocurría con el MDA (Silvestre et al., 2010), en nuestro estudio todas las muestras fueron procesadas antes de transcurrir 30 días desde su recogida y almacenamiento a -80°C , para garantizar que la congelación no afectara a la actividad GPx y sus posibles diferencias entre los distintos grupos.

En cuanto al efecto de la mastitis, contrariamente a lo que ocurre con el contenido en polifenoles totales se aprecia, tanto al inicio como al final del estudio que la concentración de GSH en la leche de las madres con mastitis es menor que la de los controles, no siendo esta diferencia estadísticamente significativa (Figura 38). Nuestros resultados concuerdan con trabajos anteriores realizados en animales, en los que se produce también una disminución de la concentración de GSH en la leche de las vacas afectadas por esta patología (Sadek et al., 2017).

En cuanto a los resultados obtenidos al medir la actividad de la GPx, se observa que ésta es significativamente mayor a día 1 en la leche de las madres con mastitis frente a las de control (Figura 37). Esto podría deberse al mecanismo compensatorio anteriormente citado para la CAT y polifenoles, en el que el organismo trata de hacer frente a la mastitis incrementando la síntesis y/o actividad de sus antioxidantes naturales (Chevari et al., 1992; González-Párraga et al., 2003). Estos mecanismos no pueden sostenerse a lo largo del tiempo y de hecho, tras 21 días de evolución de la mastitis ya no se observa este aumento de actividad GPx (Figura 37). A día de hoy no existe ningún trabajo que valore la actividad GPx en leche humana de madres con mastitis, por lo que no podemos hacer una valoración de nuestros resultados. Sí existen otros trabajos realizados en leche y plasma de animales con mastitis en los que la GPx está disminuida (Atroshi et al., 1986; Mukherjee 2008; Dimri et al., 2013). Posiblemente, estas diferencias se deban a un comportamiento distinto de esta enzima en otras especies o a que no se recogieron las muestras en el mismo momento de evolución de la enfermedad.

Por otro lado, estos resultados indican que no todos los antioxidantes se ven afectados de la misma manera o no responden de la misma forma a la mastitis, y por eso precisamente, además de medir la CAT hemos tenido interés en analizar algunos de los componentes más importantes de la defensa antioxidante por separado.

Cuando analizamos la variación de la concentración de GSH y actividad GPx a lo largo del tiempo (Tabla 17 y 18; y figura 39 y 41), no se observan diferencias significativas en su evolución entre los distintos grupos por lo que, en el caso de estos antioxidantes, no podemos decir que los arándanos tengan un efecto significativo sobre la leche. Curiosamente un estudio realizado en búfalos con un diseño similar al de nuestro estudio en el que se suplementó con vitaminas A, D y E, concluyó que el suplemento con vitaminas sí era capaz de inducir un incremento de actividad de la GPx (Dimri et al., 2013). Teniendo en cuenta que en nuestro estudio los arándanos no tienen efecto sobre la actividad GPx o concentración GSH, pero si hemos visto un efecto significativo de los arándanos sobre la variación en la concentración de polifenoles a lo largo del tiempo, parece que el tipo de suplemento

antioxidante escogido podría tener un efecto diferencial sobre los distintos componentes de la defensa antioxidante.

Cabe resaltar además, que los arándanos sí atenuaron significativamente la disminución de la CAT en leche de madres con mastitis aunque no consiguieron recuperarla a valores equivalentes a los de las madres sanas, como ocurrió con el contenido de polifenoles (Figuras 33 y 37). Dado que la CAT refleja la actividad del conjunto de todos los antioxidantes y sus interacciones, es posible que esa recuperación parcial de la CAT pueda deberse al efecto positivo de los arándanos sobre los polifenoles (que si se recuperaban totalmente,) mientras que no tienen efecto sobre el GSH o la GPx, y posiblemente sobre otros antioxidantes que no hemos medido en este trabajo.

VII. Conclusiones

1. En relación al estudio de los hábitos alimentarios del grupo de población seleccionado y el valor nutritivo de su dieta se concluye que:

- a. Las mujeres de nuestro estudio mostraron dietas desequilibradas y poco sanas con un bajo consumo de hidratos de carbono y elevado consumo de grasas y proteínas, sin que existan diferencias entre los distintos grupos de madres.
- b. No se observaron diferencias entre los distintos grupos de madres en la cantidad consumida de frutas y verduras (sin tener en cuenta el suplemento de arándanos).

2. En relación al efecto de la mastitis sobre el estado oxidativo de la leche, podemos concluir que:

- a. La mastitis induce un aumento de algunos componentes de la defensa antioxidante, como los polifenoles o la actividad GPx, que podrían ser responsables de la mayor capacidad antioxidante total observada en la leche de madres con mastitis al inicio de estudio. Este mecanismo compensatorio deja de observarse a día 21.
- b. Se observa un mayor daño oxidativo a proteínas en relación a la leche de madres sanas, que tras 21 días de evolución de la mastitis deja de ser significativo.

3. En relación al efecto del suplemento con arándanos sobre el balance oxidativo de la leche de las madres con mastitis se observa que:

- a. Los arándanos inducen un aumento de la concentración de polifenoles en la leche de madres con mastitis, que se ve reflejado en una atenuación de la caída de la CAT observada a lo largo del estudio en la leche de madres con mastitis en relación a la de la leche de madres sanas.

- b. Este estudio no permite observar un efecto significativo de los arándanos sobre el daño oxidativo a macromoléculas en la leche de madre con mastitis.

Conclusión final

Como resultado de este trabajo concluimos que la mastitis tiene un efecto sobre el estado oxidativo de la leche y que la suplementación con arándanos permite aumentar la actividad y el contenido en antioxidantes de la leche de madres con mastitis.

VIII. Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Aboul-Enein HY, Kruk I, Kladna A, Lichszteid K, Michalska t. Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species. *Biopolymers*, 2007; 86: 222-230.
- Abrahamse E, Minekus M, van Aken GA, van de Heijning B, Knol J, Bartke N, Oozeer R, van der Beek EM, Ludwig T. Development of the Digestive System- Experimental Challenges and Approaches of Infant Lipid Digestion. *Food Dig*, 2012; 3: 36-77.
- Abudu N, Miller JJ, Attaelmannan M, Levinson SS. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta*. 2004; 339(1-2): 11-25.
- Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G, et al. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. 1996; 327(2): 209-14.
- Aldea-Mansilla C, García de Viedma D, Cercenado E, Martín-Rabadan P, Marín M, Bouza E. Comparison of phenotypic with genotypic procedures for confirmation of coagulase-negative Staphylococcus catheter-related bloodstream infections. *J Clin Microbiol*. 2006; 44: 3.529-3.532.
- Alfadda AA, Sallam RM. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012; 2012: 936486. doi :10.1155/2012/936486. Epub 202, Aug 8.
- Al-Gubory K. H., Fowler P. A., Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010; 42: 1634-1650.
- Allen LH. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: an overview. *Am J Clin Nutr* 2005; 81: pp 1206S-2212S.
- Ameen M, Ahamad I, Musthapa MS, Rahman Q. Cytotoxic effect and role of exogenous antioxidants in carpet dust mediated toxicity in rat hepatocytes in vitro. *Toxicol In Vitro*. 2004; 18(4): 419-25.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90(17): 7915-22.

- Amir LH, Harris H, Adriske L. An audit of mastitis in the emergency department. *Journal of Human Lactation*, 1999, 15:221-224.
- Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Daere K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev*, 2015; 91(11): 625-35
- Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Etienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr*, 2012; 108: 1532-1549.
- Ankrah NA, Appiah-Opong R, Dzokoto C. Human breastmilk storage and the glutathione content. *J Trop Pediatr*. 2000 Apr; 46(2): 111-3.
- Anticona Mayra Lucía, Frígola Ana; Esteve M^a José. Determination of total polyphenols in blueberries and derivatives. *UCV - Scientia* 8(1), 2016.
- Aranceta J., Serra Majem L., Arija V., Gil A., Martínez de Vitoria E., Ortega R., et al. Objetivos nutricionales para la población española. (SENC). *Rev Esp Nutr Comunitaria* 2011; 17(4): 178-199.
- Ares S, Arena J, Díaz-Gómez M. La importancia de la nutrición materna durante la lactancia, ¿necesitan las madres lactantes suplementos nutricionales? *An Pediat (Barc)*. 2016; 84(6): 347.
- Arribas L, Almansa I, Miranda M, Muriach M, Romero FJ, Villar VM. Serum Malondialdehyde Concentration and Glutathione Peroxidase Activity in a Longitudinal Study of Gestational Diabetes. *PLoS One*. 2016 May 26; 11(5): e0155353.
- Arroyo R, Martin V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L y Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis*, 2010; 50(12): 1551-8.
- Ashton T, Young IS, Peters JR, Jones E, Jackson SK, Davies B, et al. Electron spin resonance spectroscopy, exercise, and oxidative stress: an ascorbic acid intervention study. *J Appl Physiol*. 1999; 87(6): 2032-6.
- Astrup A, Raben A. Carbohydrate and obesity. *Int J Obes*, 5(Supl) (1995), pp. 27-37.

- Atakisi O, Oral H, Atakisi E, Merhan O, Metin Pancarci S, Ozcan A, Marasli S, Polat B, Colak A, Kaya S. Subclinical mastitis causes alterations in nitric oxide, total oxidant and antioxidant capacity in cow milk. *Res Vet Sci* 2010 Aug; 89(1): 10-3.
- Atroshi F, Työppönen J, Sankari S, Kangasniemi R, Parantainen J. Possible roles of vitamin E and glutathione metabolism in bovine mastitis. *Int J Vitam Nutr Res.* 1987; 57(1): 37-43
- Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA. Reduction of bacteriuria and pyuria after ingestion of cranberry juice. *JAMA.* 1994; 271(10):751-4.
- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A, et al. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition*, 2006; 22: 616-619.
- Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; 55(3): 319-37.
- Balasundram, N., Sundram, K., & Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry.* 2006; 99(1): 191-203.
- Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*, 2013; 60: 49-74.
- Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutr Rev*, 2010; 68(3): 168-77.
- Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, Canatan H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res*, 2002; 33: 276-280.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol*, 1996; 271: C1424-C1437.
- Beecher GR. Overview of dietary flavonoids: nomenclature, occurrence and intake. *J Nutr.* 2003; 133(10): 3248S-3254S.
- Benzie, I.F.F., & Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as measurement of "antioxidant power": the Frap assay. *Analytical Biochemistry*, 1996. 239, 70-76.

- Berlett, B.S.; Stadtman, E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 1997. 272: 20313-20316.
- Bernardi FCB. Oxidative damage, inflammation, and toll-like receptor 4 pathway are increased in preeclamptic patients: a case control study. *Oxidative Medicine and cellular longevity*, 2012.
- Bernardi F. Oxidative stress and inflammation markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res* 2008; 34: 948-951.
- Berti PR, Fallu C, Cruz Agudo Y. A systematic review of the nutritional adequacy of the diet in the Central Andes. *Rev Panam Salud Publica.* 2014 Nov; 36(5): 314-23. Review.
- Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*, 2000; 49 (2 suppl 1): 3-8.
- Bhagwat, S., Haytowitz, D.B.; Holden, J.M. (Ret.). USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 3.1. U.S. 2014. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. Nutrient Data Laboratory Home Page: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/flav>
- Block G, Norkus E, Hudes M, Mandel S, Helzlsouer K. Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption? *Am J Epidemiol.* 2001; 154(12): 1113-8.
- Blumberg JB, Basu A, Krueger CG, Lila MA, Neto CC, Novontny JA, Rodriguez-Mateos A, Toner CD. Impact of Cranberries on Gut Microbiota and Cardiometabolic Health: Proceedings of the Cranberry Health Research Conference 2015. *Adv Nutr.*2016; 7(4):759S-70S
- Bohm H, Boeing H, Hempel J, Raab B, Kroke A. Flavonols, flavone and anthocyanins as natural antioxidants of food and their possible role in the prevention of chronic diseases. *Z Ernährungswiss.* 1998; 37(2): 147-63.
- Böhm F, Settergren M, Pernow J. Vitamin C blocks vascular dysfunction and release of interleukin-6 induced by endothelin-1 in humans in vivo. *Atherosclerosis.* 2007; 190(2): 408-15.
- Bolton-Smith C, Woodward M. Dietary composition and fat to sugar ratios in relation to obesity. *Int J Obes*, 18 (1994), pp. 820-828

- Borowczyk E, Caton JS, Redmer DA, Bilski JJ, Weigl RM, Vonnahme KA, Borowicz PP, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Effects of plane of nutrition on in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. *J Anim Sci*, 2006; 84:1593-1599.
- Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial generation of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 1975; 54(3): 311-4.
- Bowen PE, Mobarhan S, Smith JC Jr. Carotenoid absorption in humans. *Methods Enzymol*, 1993; 214: 3-17.
- Boyer JZ, Jandova J, Janda J, Vleugels FR, Elliot DA, Sligh JE. Resveratrol-sensitized UVA induced apoptosis in human keratinocytes through mitochondrial oxidative stress and pore opening. *J Photochem Photobiol B*, 2012. 113: 42-50.
- Brandt K, Christensen LP, Hansen-Moller J, Hansen SL, Haraldsdottir J, Jespersen L, et al. Health promoting compounds in vegetables and fruits: a systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends Food Sci Tech*, 2004; 15: 384-393.
- Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev.* 1998; 56(11): 317-33.
- Bredt DS, Hwang PM, Glatt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature.* 1991; 351(6329): 714-8.
- Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*, 1995; 18: 1033-1077.
- Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J.* 1999; 13(10): 1145-55.
- Brigelius-Flohé R. Glutathione peroxidases and redox-regulated transcription factors. *Biol Chem.* 2006; 387(10-11): 1329-35.
- Brown GC. Nitric oxide and neuronal death. *Nitric Oxide* 2010; 23(3): 153–165. 47.

- Burns J, Fraser PD, Bramley PM. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochem*, 2003; 62: 939-947.
- Burton, G. J. and Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2011; 25: 287-299.
- Busch C, Burkard M, Leischner C, Lauer UM, Frank J, Venturelli S. Epigenetic activities of flavonoids in the prevention and treatment of cancer. *Clin Epigenetics*, 2015; 7-64.
- Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 1989; 58: 79-110.
- Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 2000; 29: 222-30.
- Canfield LM, Clandinin MT, Davies DP, Fernandez MC, Jackson J, Hawkes J, et al. Multinational study of major breast milk carotenoids of healthy mothers. *Eur J Nutr*, 2003; 42: 133-141.
- Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, et al. The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J*. 2010; 9: 3.
- Carmichael AR, Dixon JM Is lactation mastitis and shooting breast pain experienced by women during lactation caused by *Candida albicans*? *Breast*. 2002; 11: 88-90.
- Cassano A, Drioli E, Galaverna G, Marchelli R, Di Silvestro G, Cagnasso P. Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. *J Food Eng*, 2003; 57: 153-163.
- Castillo-Castañeda PC, Gaxiola-Robles R, Labrada-Martagón V, Acosta Vargas B, Méndez-Rodríguez LC, Zenteno-Savín T. Oxidative damage to proteins related to metals and antioxidant defenses in breastmilk. *Nutr Hosp*. 2017 Feb 1;34(1):59-64.
- Çekiç SD, Demir A, Başkan KS, Tütem E, Apak R. Determination of total antioxidant capacity of milk by CUPRAC and ABTS methods with separate characterisation of milk protein fractions. *J Dairy Res* 2015 May;82(2):177-84.
- Cervato G, Cazzola R, Cestaro B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int J Food Sci Nutr*, 1999; 50: 291-206.

- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59(3): 527-605.
- Cheal SM, Ng M, Barrios B, Miao Z, Kalani AK, Meares CF. Mapping protein-protein interactions by localized oxidation: consequences of the reach of hydroxyl radical. *Biochemistry*, 2009; 48: 4577-4586.
- Cheeseman KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull.* 1993; 49(3): 481-93.
- Chen H, Wang P, Han Y, Ma J, Troy FA 2nd, Wang B. Evaluation of dietary intake of lactating women in China and its potential impact on the health of mothers and infants. *BMC Womens Health.* 2012 Jul 16;12:18.
- Chevari S, Andial T, Benke k, Shtrenger Ia. Free radical reactions and cáncer. *Vopr Med Khim*, 1992. 38 (5):4-5.
- Cho SH, Lee CH, Ahn Y, Kim H, Kim H, Ahn CY, Yang KS, Lee SR. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H₂O₂ mediated cell signaling. *FEBS* 2004; Lett. 560, 7–13.
- Cipak Gasparovic A, Zarkovic N, Zarkovic K, Semen K, Kaminsky D, Yelisyeyeva O, Bottari SP. Biomarkers of oxidative and nitro-oxidative stress: conventional and novel approaches. *Br J Pharmacol*, 2016.
- Cloetens L, Panee J, Åkesson B. The antioxidant capacity of milk-the application of different methods in vitro and in vivo. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2013 Nov 3; 59(1): 43-57. Review.
- Codoñer-Franch P, Hernández-Aguilar MT, Navarro-Ruiz A, López-Jaén AB, Borja-Herrero C, Valls-Bellés V. Diet supplementation during early lactation with non-alcoholic beer increases the antioxidant properties of breastmilk and decreases the oxidative damage in breastfeeding mothers. *Breastfeed Med.* 2013 Apr;8:164-9.
- Cote, J.; Caillet, S.; Doyon, G.; Sylvain, J.-F.; Lacroix, M. Bioactive compounds in cranberries and their biological properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition.* 2010, 50(7), 666-679.
- Creasy RK, Reznik R, Iams J. *Maternal-Fetal Medicine*, 5.^a ed. Filadelfia: WB Saunders, 2004.

- Dandrifosse G, Peulen O, El KN, Deloyer P, Dandrifosse AC, Grandfils C. Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proc Nutr Soc*, 2000; 59: 81-86.
- Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*. 1995; 61: 1-31.
- Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2010; 15: 191-195.
- Delgado S, Arroyo R, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Mastitis infecciosas durante la lactancia: un problema infravalorado I. *Acta Pediátrica Española*. 2009; 67 (2) y (3).
- Delplanque B, Gibson R, Koletzko B, Lapillonne A, Strandvik B. Lipid Quality in Infant Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2015, Apr 15.
- Deng S, Yu K, Jiang W, Li Y, Wang S, Deng Z, Yao Y, Zhang B, Liu G, Liu Y, Lian Z. Over-expression of Toll-like receptor 2 up-regulates heme oxygenase-1 expression and decreases oxidative injury in dairy goats. *J Anim Sci Biotechnol*, 2017; 8:3.
- De Pee S, West CE. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr*, 1996; 50: S38-S53.
- De Silva GDI, Kantzanou M, Justice A, Massey RC, Wilkinson AR, Day NPJ, et al. The *ica* operon and biofilm production in coagulase-negative staphylococci associated with carriage and disease in a neonatal intensive care unit. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 382-388.
- Dessi, A.; Atzei, A. y Fanos, V. 2011. Cranberry in children: prevention of recurrent urinary tract infections and review of the literature. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(5): 807-813.
- Díaz NM. Retención y mastitis. En: *Lactancia materna: guía para profesionales*. Monografías de la Asociación Española de Pediatría. Madrid: Ergón, 2004.
- Díaz-Castro J. The timing of cord clamping and oxidative stress in term newborns. *Pediatrics* 2014, 134: pp 257-64.
- Dimri U, Sharma MC, Singh SK, Kumar P, Jhambh R, Singh B, Bandhyopadhyay S, Verma MR. Amelioration of altered oxidant/antioxidant balance of Indian water

- buffaloes with subclinical mastitis by vitamins A, D3, E, and H supplementation. *Trop Anim Health Prod.* 2013 Apr;45(4):971-8.
- Dinarello CA. Interleukin-1. *Reviews of Infectious Diseases*, 1984, 6(1):51-95.
- Dittrich R, Hoffmann I, Stahl P, Müller A, Beckmann MW, Pischetsrieder M. Concentrations of N^ε-Carboxymethyllysine in Human Breast Milk, Infant Formulas, and Urine of Infants. *J. Agric. Food Chem*, 2006; 54: 6924–6928.
- Drehmer E, Valls V, Muñiz P, Cabo J, Sáez GT. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and antioxidant status in rat liver fed with olive and corn oil diets: Effect of ascorbic acid supplementation. *J Food Lipids*. 2001; 8(4): 281-94
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002; 82: 47-95.
- Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*, 2012; 748: 145-169.
- Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1826(2): 443-57.
- Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen / nitrogen species. *Glycobiology*, 2011; 21: 401-409.
- Durham HA, Lovelady CA, Brouwer RJ, Krause KM, Ostbye T. Comparison of dietary intake of overweight postpartum mothers practicing breastfeeding or formula feeding. *J Am Diet Assoc.* 2011 Jan; 111(1):67-74.
- EFSA. Scientific Opinion of the Panel on Dietetic products, Nutrition and Allergies on a request from European Commission on the review of labelling reference intake values for selected nutritional elements. *The EFSA Journal*, 2010; 1008, 1-3
- El-Deeb W. Clinicobiochemical investigations of mastitis in does: Immunological responses and oxidative stress biomarkers. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2013;14(1):33–39.
- Ellingsen I, Seljeflot I, Arnesen H, Tonstad S. Vitamin C consumption is associated with less progression in carotid intima media thickness in elderly men: A 3-year intervention study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009; 19: 8-14.

- Epplein M, Shu XO, Xiang YB, Chow WH, Yang G, Li HL, et al. Fruit and vegetable consumption and risk of distal gastric cancer in the Shanghai Women's and Men's Health studies. *Am J Epidemiol*, 2010; 172: 397-406.
- Erdem M, Harma M, Harma IM, et al. Comparative study of oxidative stress in maternal blood with that of cord blood and maternal milk. *Arch Gynecol Obstet*, 2012; 285: 371–375.
- Erdman JW Jr, Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 1993; 691, 76-85.
- Eslami H, Batavani RA, Asr I-Rezaei S, Hobbenaghi R. Changes of stress oxidative enzymes in rat mammary tissue, blood and milk after experimental mastitis induced by E. coli lipopolysaccharide. *Vet Res Forum*, 2015; 6(2):131-6.
- Esterbauer H, Schaur RJ and Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991; 11:81-128.
- Ezaki S, Ito T, Suzuki K, Tamura M. Association between total antioxidant capacity in breast milk and postnatal age in days in premature infants. *J Clin Biochem Nutr*, 2008; 42: 133–137.
- Fang YZ, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*. 2002; 18(10): 872-9.
- FAO. Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition. Interim Summary of Conclusions and Dietary Recommendations on Total Fat & Fatty Acids. 2010
- Feghali, K.; Feldman, M.; La, V. D.; Santos, J.; Grenier, D. Cranberry Proanthocyanidins: Natural Weapons against Periodontal Diseases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012, 60(23), 5728-5735.
- Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Trans*. 1894; 65: 899-910.
- Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marin M, Jiménez E, Rodríguez JM. Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes*, 2014; 5(2): 169-83.

- Fernández-Vergel R, Peñarrubia-María MT, Rispau-Falgàs A, Espín-Martínez A, Gonzalo-Miguel L, Pavón-Rodríguez F. Do we really follow the Mediterranean diet? *Aten Primaria* 2006 Feb 28; 37(3): 148-53.
- FESNAD. Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética. Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española. Madrid: Eunsa; 2010.
- Fewtrell MS. Breast-feeding and later risk of CVD and obesity: Evidence from randomised trials. *PROC NUTR SOC*, 2011; 70: 472-477.
- Filteau SM, Lietz G, Mulokozi G et al. Milk cytokines and subclinical breast inflammation in Tanzanian women: effects of dietary red palm oil or sunflower oil supplementation. *Immunology*, 1999, 97:595-600.
- Fillebeen C, Pantopaulos K. Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep* 2002. 7:15-22.
- Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*. 2006; 36(4): 327-58.
- Förstermann U, Sessa WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur Heart J*. 2012; 33(7): 829-37.
- Foxman B, D'Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol*. 2002; 155: 103-114.
- Franke AA, Halm BM, Custer LJ, Tatsumura Y, Hebshi S. Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy. *Am J Clin Nutr*, 2006;84:406-13.
- Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol*. 1990; 264: 155-63.
- Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*. 1994; 97(3A): 5S-13S; discussion 22S-28S.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O₂⁻), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*. 1997; 272(30): 18515-7.
- Fridovich I. Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*. 1974; 41(0): 35-97.
- Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*. 1978; 201(4359): 875-80.

- Friel JK, Diehl-Jones B, Cockell KA, Chiu A, Rabanni R, Davies SS et al. Evidence of oxidative stress in relation to feeding type during early life in premature infants. *Pediatr Res*, 2011; 69: 160-4.
- Frigerio C, Schutz Y, Prentice A, Whitehead R, Jéquier E. Is Human Lactation a Particularly Efficient Process? *European Journal of Clinical Nutrition*, 1991; 45: 459-462.
- García-Alonso FJ, Guidarelli A, Periago MJ. Pehnolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: The role of iron chelation. *J Nutr Biochem*, 2007; 18: 457-466.
- García-Arenzana N, Navarrete-Muñoz EM, Vázquez-Carrete JA, Moreno MP, Vidal C, Salas D, Ederria M, Pedraz C, Collado-García F, Sánchez-Contador C, González-Román I, García-López M, Miranda J, Peris M, Moreo P, Santamariña C, Pérez-Gómez B, Vioque J, Pollán M; grupo DDM-Spain. Compliance with current dietary recommendations and geographical variability of diet in women participating in 7 screening programs for breast cancer in Spain. *Nutr Hosp*. 2011 Jul-Aug;26(4):863-73.
- García Casanova MC, García CS, Pi JM, Ruiz ME, Parellada EN. Lactancia materna. ¿Puede el personal sanitario influir positivamente en su duración? *Aten Primaria*. 2005; 35: 295-300.
- Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem*, 2000; 68: 471-474.
- Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000 Dec;29(11):1106-14.
- González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast*, 2003; 20(14):1161-9.
- Gossage CP, Deyhim M, Yamini S, Douglass LW, Moser-Veillon PB. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to beta-carotene supplementation. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76: 193-197.

- Grazioso CF, Buescher ES. Inhibition of neutrophil function by human milk. *Cell Immunol*, 1996; 168: 125-32.
- Griffith OW. Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(9-10): 922-35.
- Griffiths HR, Unsworth J, Blake DR, Lunec J. Free radicals in chemistry, pathology and medicine. London: Richelieu, 1988.
- Griffiths HR, Moller L, Bartosz G, Bast A, Bertoni-Freddari C, Collins A, et al. Biomarkers. *Mol Aspects Med*. 2002; 23(1-3): 101-208.
- Grisham MB, Jourd'Heuil D, Wink DA. Nitric Oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*, 1999; 276(2 Pt 1): G315-21.
- Gunther M. Discussion on the breast in pregnancy and lactation. *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 1958, 51 (Section of General Practice):305-309.
- Hailelassie K, Mulugeta A, Girma M. Feeding practices, nutritional status and associated factors of lactating women in Samre Woreda, South Eastern Zone of Tigray, Ethiopia. *Nutr J*. 2013 Mar 1;12:28.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press; 1989.
- Halliwell B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 1996; 16: 33-50.
- Halliwell B. Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. *Antioxidants in Diabete Management* 2000; pp 33-52.
- Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35: 1147-1150.
- Halliwell B. Free radical and antioxidants-quo vadis? *Trends Pharmacol Sci*. 2011; 32(3): 125-30.
- Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 2012; 70: 257-265.

- Han CH, Kim SH, Kang SH, Shin OR, Lee HK, Kim HJ, Cho YH. Protective effects of cranberries on infection-induced oxidative renal damage in a rabbit model of vesico-ureteric reflux. *BJU Int*, 2007; 100(5):1172-5.
- Hancock, J. F.; Lyrene, P.; Finn, C. E.; Vorsa, N. y Lobos, G. A. 2008. Blueberries and cranberries. En: *Temperate fruit crop breeding. Springer Netherlands*, 115-150.
- Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development Breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc*, 2007; 66: 384-396.
- Hanson C, Lyden E, Furtado J, Van Ormer M, Anderson-Berry A. A Comparison of Nutritional Antioxidant Content in Breast Milk, Donor Milk, and Infant Formulas. *Nutrients*. 2016 Oct 28;8(11).
- Harborne JB. *The flavonoids: Advances in research since 1986*. London: Chapman and Hall; 1994
- Haskell MJ, Brown KH. Maternal vitamin A nutriture and the vitamin A content of human milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1999; 4: 243-57.
- Hassiotou F, Hartmann PE. At the dawn of a new discovery: the potential of breast milk stem cells. *Adv Nutr*, 2014; 14: 770-778.
- Hausladen A, Stamler JS; 1999. Nitrosative stress. *Methods Enzymol* 300: 389-395.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002; 13(10): 572-584.
- Herrera E, Jiménez R, Aruoma OI, Hercberg S, Sánchez-García I, Fraga C. Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutr Rev*, 2009; 67(Suppl 1): S140-4.
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jun 24;100(13):7919-24.
- Hopkins FG. On an autoxidisable constituent of the cell. *Biochem J*. 1921; 15(2): 286-305.
- Hoppu U, Rinne M, Salo-Vaananen P, Lampi AM, Piironen V, Isolauri E. Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *Eur J Clin Nutr*, 2005; 59:123-8.

- Hughes LE, Mansel RE, Webster DJT. Infection of the breast. *Benign disorders and diseases of the breast*. Londres, Baillière Tindal, 1989:143-149.
- IOM, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press; 2000.
- Isa F, Xie LP, Hu Z, Zhong Z, Hemelt M, Reulen RC, et al. Dietary consumption and diet diversity and risk of developing bladder cancer: results from the South and East China case-control study. *Cancer Causes Control*, 2013; 24: 885-895.
- Jackson MJ, Papa S, Bolaños J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, et al. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med*, 2002; 23: 209-285.
- Jahanfar S, Ng CJ, Teng CL. Antibiotics for mastitis in breastfeeding women. *Sao Paulo Med J*, 2016; 134(3):273.
- Jahanfar S, Ng CJ, Teng CL. Antibiotics for mastitis in breastfeeding women. *Cochrane Database syst Rev*, 2013; 28(2):CD005458
- Janaszewska A, Bartosz G. Assay of total antioxidant capacity: comparison of four methods as applied to human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest*. 2002; 62(3): 231-6.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 1990; 9:515-540.
- Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci*, 2012; 37: 503-517.
- Jensen PK. Antimycin-insensitive oxidation of succinate and reduced nicotinamide-adenine dinucleotide in electron-transport particles. *Biochim Biophys Acta*. 1966; 122(2): 157-74.
- John JH, Ziebland S, Yudkin P, Roe LS, Neil HA, et al. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002; 359: 1969-1974.

- Kamelska AM, Pietrzak-Fiecko R, Bryl K. Variation of the cholesterol content in breast milk during 10 days collection at early stages of lactation. *Acta Biochim Pol*, 2012; 59: 243-247.
- Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*, 1994; 350: 9-12.
- Ketterer B. Detoxication reactions of glutathione and glutathione transferases. *Xenobiotica*. 1986; 16(10-11): 957-73.
- Kim C, Kim JY, Kim JH. Cytosolic phospholipase A(2), lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Rep*. 2008; 41(8): 555-9.
- Kinnula VL, Crapo JD, Raivio KO. Generation and disposal of reactive oxygen metabolites in the lung. *Lab Invest*. 1995; 73(1): 3-19.
- Klatt P, Lamas S. Regulation of protein function by S-glutathiolation in response to oxidative and nitrosative stress. *Eur j Biochem*, 2000. 267:4928-4944.
- Klaunig JE, Xu Y, Bachowski S, Jiang J. Free-radical oxygen-induced changes in chemical carcinogenesis. Wallace KB, editor. *Free Radical Toxicology*. London: Taylor & Francis; 1997.
- Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschütter A, Beisiegel U. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res*. 1996; 37(7): 1436-48.
- Korycka-Dahl M, Richardson T. Initiation of oxidative changes in food. *J Dairy Sci*, 1980; 63: 1181-98.
- Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakylas AG. Review. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 2011; 711: 193-201.
- L'Abbe MR, Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000; 31: 270-174.
- Lamas S, Marsden PA, Li GK, Tempst P, Michel T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89(14): 6348-52.

- Lamers Y. Folate recommendations for pregnancy, lactation, and infancy. *Ann Nutr Metab.* 2011; 59:32-7.
- Larqué E, Sabater-Molina M, Zamora S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 2007; 23: 87-95.
- Lawrence R.A, Parkhill L.K, Burk R.F. Hepatic cytosolic non-selenium dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J. Nutr.* 1978, 108: 981-987.
- Lawrence RA. *Breastfeeding - a guide for the medical profession*, 5ª ed. St. Louis, CV Mosby, 1999 (pp.273-283).
- Lawrence R. Biochemistry of human milk. In *Breastfeeding: a guide for the medical profession*. Lawrence RA and Lawrence RM eds. 6th edition. Mosby, Philadelphia, 2005, pp:105-170.
- Lawrence R, Pane C. Human Breast Milk: Current concepts of Immunology and Infectious Diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2007; 37: 7-36.
- Lawrence RA, Lawrence RM. Biochemistry of human milk. In: Elsevier Health Sciences, editor. *Breastfeeding. A guide for the Medical Profession* (7th ed). Elsevier/Mosby ed. Maryland Heights, Missouri, 2010. p. 105-111.
- Leach JK, Van Tuyle G, Lin PS, Schmidt-Ullrich R, Mikkelsen RB. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 2001; 61(10): 3894-901.
- Lee WL, Davis JM. Future Applications of Antioxidants in Premature Infants. *Curr Opin Pediatr*, 2011; 23: 161-166.
- Lee HC, Wei YH. Mitochondria and aging. *Adv Exp Med Biol.* 2012; 942: 311-27.
- Leo MA, Ahmed S, Aleynik SI, Siegel JH, Kasmin F, Lieber CS. Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions. *J Hepatol*, 1995; 23: 550-556.
- Levine, R.L., Garland D., Oliver C.N., Amici A., Climent I., Lenz A.G., Ahn B.W., Shatiel, S. And Stadtman, E.R. (1990) Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186: 466-478.
- Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Bioch*, 2005; 99: 293-305.

- Li W, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*, 2009; 25: 105–114.
- Li-Li L, Qingzhang L. Oxidative damage and changes of antioxidant defense system in mastitis goat during lactation. *Chin Dairy Industry*. 2009;37(5):1–5.
- Lindmark-Mansson H, Akesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr*, 2000; 84 Suppl 1: S103-S110.
- Lindsay DG, Astley SB. European research on the functional effects of dietary antioxidants- EUROFEDA. *Mol Aspects Med*. 2002; 23(1-3): 1-38.
- Liu H, Zhao H, Li B, Kalyanaraman A, Nicolosi C, Gutterman DD. “Mitochondrial sources of H₂O₂ generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries,” *Circulation Research*, 2003; 93: 573–580.
- Liu H, Zheng F, Cao Q, Ren B, Zhu L, Striker G, et al. Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006; 290: E824-E832.
- Lonnerdal B. Nutritional and Physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*, 2003; 77(suppl): 1537S–1543S.
- Lonnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr*, 2010; 156 (2 suppl): S26-S30.
- López-Pedrajas R, Ramírez-Lamelas DT, Muriach B, Sánchez-Villarejo MV, Almansa I, Vidal-Gil L, Romero FJ, Barcia JM, Muriach M. Cocaine promotes oxidative stress and microglial-macrophage activation in rat cerebellum. *Front Cell Neurosci*. 2015 Jul 28; 9: 279.
- McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(7-8): 1034-53.
- Macías C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab*, 2001; 45: 82-85.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nut*, 2004; 79: 727-47.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81(1 Suppl): 230S-242S.

- Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005; 16(10): 577-86.
- Mataix J. Nutrición y alimentación humana. Situaciones fisiológicas y patológicas. Vol II. 1ª edición. Ed. Ergón. Madrid, 2002. ISBN: 84-8473-088-3.
- Mathews CK, van Holde KE. Bioquímica. 2ª ed. Madrid: McGraw Hill Interamericana; 1998.
- Matos C, Moutinho C, Balçao V, Almeida C, Ribeiro M, Franklim-Marques A, Guerra A. Total antioxidant activity and trace elements in human milk: the first 4 months of breast-feeding. *Eur Food Res Technol*, 2009; 230: 201-208.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem*. 1969; 244(22): 6049-55.
- McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 2000; 108: 652-659.
- Meister A, Anderson, ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711-760.
- Mello-Neto J, Rondo PH, Oshiiwa M, Morgano MA, Zacari CZ, Domingues S. The influence of maternal factors on the concentration of vitamin A in mature breast milk. *Clin Nutr*, 2009; 28: 178–181.
- Mello-Neto J, Rondó PH, Morgano MA, Oshiiwa M, Santos ML, Oliveira JM. Iron concentrations in breast milk and selected maternal factors of human milk bank donors. *J Hum Lact*, 2010; 26: 175-179.
- Michalski MC. Lipids and milk fat globule properties in human milk. In Zibadi sm Watson RR, Preedy VR, eds. *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2013. pp 315-334.
- Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*. 2000; 52(4): 673-751.
- Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem*, 1996; 271: 40-47.

- Miller, Rice Evans. "Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS•+ Radical Cation Assay". *Free Rad. Res.* 1997, Vol.26, 195-199.
- Minchin MK. *Breastfeeding Matters*, 4^a ed. Australia, Alma Publications, 1998 (pp. 151-165).
- Miner JC, Bissé E, Aebischer CP, Bell A, Wieland H, Lutschg J, "Assessment of vitamin B-12, folate, and vitamin B-6 status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates," *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 72: 751–757.
- Mira L, Fernández MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res.* 2002; 36(11): 1199-208.
- Muriach M, Bosch-Morrell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ and Miranda M. Lutein effects on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 2006; 41:979-984.
- Muriach M, Bosch-Morrell F, Arnal E, Alexander G, Blomhoff R, Romero FJ. Lutein prevents the effect of high glucose levels on immune system cells in vivo and in vitro. *J Physiol Biochem.* 2008 Jun; 64(2):149-57.
- Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, Silvestre D. Stability of the antioxidant capacity and pH of human milk refrigerated for 72 hours: longitudinal study. *Nutr Hosp*, 2011; 26(4):722-8.
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Bosch-Morell, F; Romero FJ, Silvestre D. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors*, 2004; 20(3):129-37.
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, Arnal E, Messeguer A, Díaz-Llopis M, Romero FJ, Bosch-Morell F. CR-6 protects glutathione peroxidase activity in experimental diabetes. *Free Radic Biol Med.* 2007 Dec 1;43(11):1494-8.
- Miyata T, Inagi R, Asahi K, Yamada Y, Horie K, Sakai H, et al. Generation of protein carbonyls by glycooxidation and lipoxidation reactions with autoxidation products of ascorbic acid and polyunsaturated fatty acids. *FEBS Lett.* 1998; 437(1-2): 24-8.

- Mukherjee R. Selenium and vitamin E increases polymorphonuclear cell phagocytosis and antioxidant levels during acute mastitis in riverine buffaloes. *Vet Res Commun*. 2008 Apr;32(4):305-13.
- Mullen, W., Marks, S.C., Crozier, A. Evaluation of phenolic compounds in commercial fruit juices and fruit drinks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55, 3148–3157
- Muriach M, Flores-Bellver M, Romero FJ, Barcia JM. Diabetes and the brain: oxidative stress, inflammation, and autophagy. *Oxid Med Cell Longev*. 2014; 2014:102158.
- Murphy, MS, "Growth factors and the gastrointestinal tract," *Nutrition*, 1998; 14: 771–774.
- Mutinati M, Roncetti M, Piccino M, Rizzo A, Sciorsci RL. Oxidative stress in neonatology. A review. *Rep Dom An* 2014; 49: 7-16.
- Nagura J, Iso H, Watanabe Y, Maruyama K, Date C, Toyoshima H, et al. Fruit, vegetable and bean intake and mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women: the JACC Study. *Br J Nutr* 2009; 102: 285-92.
- Nardi GM, Farias Januario AG, Freire CG, Megiolaro F, Schneider K, Perazzoli MR, Do Nascimento SR, Gon AC, Mariano LN, Wagner G, Niero R, Locatelli C. Anti-inflammatory Activity of Berry Fruits in Mice Model of Inflammation is Based on Oxidative Stress Modulation. *Pharmacognosy Res*, 2016 (Suppl 1):S42-9.
- Nathan C, Xien QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*. 1994; 269(19): 13725-8.
- Nathan, C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest*, 2003; 111: 769–778.
- Neto, C.C. Cranberry and Its Phytochemicals: A Review of In Vitro Anticancer Studies. *The Journal of Nutrition*. 2007, 137, 186S–193S.
- Newburg DS. Recent advances in human milk glycobiology. *Pediatr Res*, 2014; 75: 675-679.
- Nicotra A, Pierucci F, Parvez H, Senatori O. Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology*, 2004; 25: 155-65.

- Nikniaz L, Mahdavi R, Ostadrahimi A, Hejazi MA, Vatankhah AM. Effects of synbiotic supplementation on total antioxidant capacity of human breastmilk. *Breastfeed Med.* 2013 Apr;8:217-22.
- Novy MJ. Disorders of lactation. In: Benson RC, eds. *Obstetric and gynecologic diagnosis and treatment*. Los Altos, Lange Medical Publications, 1984:864-867.
- Obama T, Kato R, Masuda Y, Takahashi K, Aiuchi T, Itabe H. Analysis of modified apolipoprotein B-100 structures formed in oxidized low-density lipoprotein using LC-MS/MS. *Proteomics.* 2007; 7(13): 2132-41.
- Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, et al. Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72 h of life. *Free Radic Res,* 2003; 37: 317–322.
- Olafsdottir AS, Wagner KH, Thorsdottir I, Elmadfa I. Fat-soluble vitamins in the maternal diet, influence of cod liver oil supplementation and impact of the maternal diet on human milk composition. *Ann Nutr Metab,* 2001; 45: 265-272.
- Olson JA, Krinsky NI. Introduction: the colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators. *FASEB J.* 1995; 9(15): 1547-50.
- OMS (WHO). Mastitis: causa y manejo. Ginebra: OMS, 2000.
- OMS (WHO). The optimal duration of exclusive breastfeeding. Results of a WHO systematic review. Note for the press n.º 7, 2 April 2001.
- OMS (WHO). Estrategia mundial sobre régimen alimentario, actividad física y salud. 57ª Asamblea Mundial de la Salud. A57/9, Abril, 2004.
- OMS (WHO). Alimentación en circunstancias excepcionalmente difíciles. Salud del recién nacido. Septiembre, 2015.
- O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL 3rd. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *Nutr J,* 2012; 11: 107.
- Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. National Academy of Sciences. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Eds. New York, 2006. ISBN 0-309-65646-X.

- Oveisi MR, Sadeghi N, Jannat B, Hajimahmoodi M, Behfar AO, Jannat F, Mokhtarinasab F. Human breast milk provides better antioxidant capacity than infant formula. *Iran J Pharm Res.* 2010 Fall;9(4):445-9.
- Ozgovva S, Hermanek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol.* 2003; 66(7): 1127-37.
- Ozgurtas T, Aydin I, Turan O et al., "Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates". *Cytokine*, 2010; 50: 192–194.
- Pallás Alonso CR, Colomer Revuelta J, Cortes Rico J, Esparza Olcina MJ, Galbe Sánchez Ventura J, García Aguado J, Martínez Rubio A, Mengual Gil JM, Merino Molina M, Sánchez Ruiz-Cabello FJ, Soriano Faura FJ. Suplementación de yodo en la gestación y la lactancia. *Revista de Pediatría de Atención Primaria*, 2014; 16:147-153.
- Pan MH, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Mol Nutr Food Res*, 2008; 52: 43-52
- Park SG, Kim JH, Xia Y, Sung JH. Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin Ther Targets* ,2011; 15: 1297-1306.
- Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J* ,1996; 10: 542-551.
- Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in the mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* 2000; 304(1): 55-68.
- Pazos M, Andersen ML, Medina I, Skibted LH. Efficiency of natural phenolic compounds regenerating α -tocopherol from α -tocoperoxyl radical. *J Agric Food Cehm*, 2007; 55: 3661-3666.
- Pcciano MF, McGuire MK. Use of dietary supplements by pregnant and lactating woman in North America. *Am J Clin Nut* 2009; 89: pp 6635-6675.

- Pellegrini N.; Proteggente A.; Pannala A.; Yang M.; Rice Evans C. Antioxidant activity applying an improve ABTS radical cation decoloration assay. *Free Radical Biology & Medicine* 1999; 26: 1231-1237.
- Pfaender S, Heyden J, Friesland M, Ciesek S, Ejaz A, Steinmann J, Malarski A, Stoiber H, Tsiavaliaris G, Bader W, Pietschmann T, Steinmann E. Inactivation of hepatitis C virus infectivity by human breast milk. *J Infec Dis*, 2013; 208: 1943-1952.
- Picó C, Oliver P, Sánchez J, Miralles O, Caimari A, PriegoT, Palou A. The intake of physiological doses of leptin during lactation in rats prevents obesity in later life. *Int J Obes (Lond)* 2007. 31(8):1199-209
- Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant status. *Biochem Mol Biol Int*, 1998; 46: 895-903.
- Poiroux-Gonord F, Bidel LP, Fanciullino AL, Gautier H, Lauri-Lopez F, Urban L. Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches. *J Agric Food Che*, 2010; 58: 12065-12082.
- Polesel J, Negri E, Serraino D, Parpinel M, Barzan L, Libra M, et al. Dietary intakes of carotenoids and other nutrients in the risk of nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Italy. *Br J Cancer*, 2012; 107: 1580-1583.
- Pomposiello PJ, Demple B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol*, 2002; 46: 319–341.
- Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A. NO₂ reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med*, 1995; 19: 553-563.
- Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med*. 1999 Dec; 27(11-12): 1173-81. Review.
- Pryor WA & Stanley JP. A suggested mechanism for the production of malonaldehyde during the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autoxidation. *J Org Chem* 1975 Nov 28;40(24):3615-7.

- Quiles JL, Ochoa JJ, Ramírez-Tortosa MC, Linde J, Bompadre S, Battino M, Narbona E, Maldonado J, Mataix J. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Res Free Radic* . 2006 Feb; 40 (2): 199-206.
- Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999 May;26(9-10):1231-7.
- REDUCA (Biologia) 2014. Serie Botánica 7 (2): 100-112
- Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. High performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry* 1980,106: 55-62.
- Reed GA. Co-oxidation of xenobiotics: lipid peroxyl derivatives as mediators of metabolism. *Chem Phys Lipids*, 1987; 44: 127-148.
- Rench MA, Baker CJ. Group B streptococcal breast abscess in a mother and mastitis in her infant. *Obstet Gynecol*. 1989; 73: 875-877.
- Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA. *Curr Opin Cell Biol*, 2005; 17: 183–189.
- Riccioni G, D’Orazio N, Palumbo N, Bucciarelli V, Ilio E, Bazzano LA, et al. Relationship between plasma antioxidant concentrations and carotid intima-media thickness: the Asymptomatic Carotid Atherosclerotic Disease In Manfredonia Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2009; 16: 351-357.
- Rice-Evans C, Burdon R. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog Lipid Res*. 1993; 32(1): 71-110.
- Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High performance liquid chromatography separation of malondialdehyde thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cell) using a commercially available reagent. *J. Chromatogr.* 1992, 577: 9-18.
- Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988; 85(17): 6465-7.

- Riley PA. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 1994; 65: 27-33.
- Riordan JM, Nichols FH. A descriptive study of lactation mastitis in long-term breastfeeding women. *J Hum Lact*. 1990 Jun;6(2):53-8.
- Romero, M. J.; Bosch-Morell, F.; Romero, B.; Rodrigo, J. M.; Serra, M. A.; Romero, F. J. (1998) Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radical Biol. Med.* 25: 993–997.
- Ronayne de Ferrer PA, Baroni A, Sambucetti ME, López NE, Ceriani Cernadas JM. Lactoferrin in term and preterm milk. *Journal of the American College of Nutrition*, 2000; 19: 370–373.
- Rubbo H. Nitric oxide and peroxynitrite in lipid peroxidation. *Medicina (B Aires)*, 1998; 58: 361-366.
- Ruifeng G, Yunhe F, Zhengkai W, Ershun Z, Yimeng L, Minjun Y, Xiaojing S, Zhengtao Y, Naisheng Z. Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced mice mastitis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway. *Eur J Pharmacol*. 2014 Apr 15;729:54-8.
- Ruiz E, Avila LM, Valero T, del Pozo S, Rodríguez P, Aranceta-Bartrina J, Gil A, González-Gross M, Ortega RM, Serra-Majem L, Varela-Moreiras G. Energy Intake, Profile, and Dietary Sources in the Spanish Population: Findings for the ANIBES Study. *Nutrients*, 2015;7:4739-4762.
- Rumsey SC, Levine M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans - Chemistry, Metabolism, and Uses. *J Nutr Biochem*. 1998; 9(3): 116-130.
- Russo A, Acquaviva R, Campisi A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Virgata G, et al. Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol*. 2000; 16(2): 91-8.
- Ryan AS, Hay WW. Challenges of infant nutrition research: a commentary. *Nutr J*. 2016; 22;15:42.
- Ryter SW, Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen ($(^1)O_2$): a possible effector of eukaryotic gene expression. *Free Radic Biol Med*, 1998; 24: 1520-34.

- Sadek K, Saleh E, Ayoub M. Selective, reliable blood and milk bio-markers for diagnosing clinical and subclinical bovine mastitis. *Trop Anim Health Prod*, 2017; 49(2): 431-437.
- Sahin E, Gumuslu S. Alterations in brain antioxidant status, protein oxidation and lipid peroxidation in response to different stress models. *Behav Brain Res*. 2004; 155(2): 241-8.
- Sanchez L, Calvo M, Brock JH. Biological role of lactoferrin. *Arch Dis Child*, 1992 ; 67: 657-661.
- Sánchez-Moreno C, Plaza L, de Ancos B, Cano MP. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice. *J Sci Food Agr*, 2003; 83: 430-9.
- Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 2014; 73C: 383-399.
- Sartori AA, Jiricny J. Enzymology of base excision repair in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem*, 2003; 278: 24563-24576.
- Sasabe N, Keyamura Y, Obama T, Inoue N, Masuko Y, Igarashi Y, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T, Kuwata H, Iwamoto S, Miyazaki A, Hara S, Yoshikawa T, Itabe H. Time course-changes in phosphatidylcholine profile during oxidative modification of low-density lipoprotein. *Lipids in Health and Disease*, 2014; 13: 48.
- Sawyer DT. The Redox Thermodynamics for Dioxygen Species (O_2 , $O_2^{\cdot-}$, HOO^{\cdot} , $HOOH$ and HOO^-) and Monooxygen Species (O , $O^{\cdot-}$, $\cdot OH$, and $^{\cdot}OH$) in Water and Aprotic Solvents. In: Simic MG, Taylor KA, Ward JF, Sonntag C, editors. *Oxygen Radicals in Biology and Medicine*. Basic Life Sciences, volume 49. New York: Plenum Press; 1988. p. 11-20.
- Say B, Dizdar EA, Degirmencioglu H, Uras N, Sari FN, Oguz S, Canpolat FE. The effect of lactational mastitis on the macronutrient content of breast milk. *Early Hum Dev* 2016 Jul; 98: 7-9.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr*, 2000; 130(8S Suppl): 2073S-2085S.
- Schack-Nielsen L, Larnkjaer A, Michaelsen KF. Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. *Adv Exp Med Biol*. 2005; 569: 16-23.

- Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. *Trends Food Sci Tech*, 2001; 12: 401-413.
- Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, Nakamura AJ, Georgakilas AG, Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res*. 2010; 704(1-3): 152-9.
- Seeram NP. Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects. *J Agric Food Chem*, 2008; 56(3):630-5.
- Sener G, Ozer Sehirli A, Ipçi Y, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, et al. Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. *Fundam Clin Pharmacol*. 2005; 19(2): 155-64.
- Serra Majem L, Ribas Barba L, Salvador Castell G, Roman Viñas B, Castell Abat C, Cabezas Peña C, Pastor Ferrer MC, Raidó Quintana B, Ngo de la Cruz J, García Alvarez A, Serra Farró J, Salleras Sanmartí L, Taradach Antoni P. Trends in the nutritional status of the Spanish population: results from the Catalan nutrition monitoring system (1992-2003) *Rev Esp Salud Publica*. 2007 Sep-Oct;81(5):559-70.
- Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L, Hochstein P. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. *Free Radic Biol Med*, 1990; 8: 145-152.
- Shah MD, Sha R, Nutrient deficiencies in the premature infant. *Pediatr Clin North Am*, 2009; 56: 1069-1083.
- Shoeb M, Jaspars M, MacManns SM, Celik S, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Sarker SD. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *centaurea gigantea* (Asteraceae) *J Nat Med*, 2007; 61: 164-169.
- Shukitt-Hale B, Galli RL, Meterko V, Carey A, Bielinski DF, Joseph JA. Dietary supplementation with fruit polyphenolics ameliorates age-related deficits in behavior and neuronal markers of inflammation and oxidative stress. *Age (Dordr)* 2005; (1): 49-57.
- Sies H. Oxidative stress: introductory remarks. Sies H, editor. *Oxidative Stress*. Orlando: Academic Press; 1985.

- Sies H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 1997; 82; 291-295.
- Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999; 27(9-10): 916-21.
- Silanikove N, Merin U, Shapiro F, Leitner G. Subclinical mastitis in goats is associated with upregulation of nitric oxide-derived oxidative stress that causes reduction of milk antioxidative properties and impairment of its quality. *J Dairy Sci*. 2014;97(6):3449-55.
- Silvestre D, López MC, March L, Plaza A, Martínez-Costa C. Bacterizidal activity of human milk: stability during storage. *Br J Biomed Sci*; 2006; 63(2):59-62.
- Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr*. 2008 Aug;97(8):1070-4.
- Silvestre D, Ruiz P, Martinez-Costa C, Plaza A, López MC. Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *J Hum Lact*, 2008, 24(4):371-6.
- Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E y Romero FJ. Frozen breast milk at -20 degrees C and -80 degrees C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. *J Hum Lact*, 2010; 26(1): 35-41.
- Silvestre Castelló D. I.3. Situaciones Fisiológicas y Etapas de la Vida. I.3.a. Salud nutricional de la mujer gestante y lactante. En: Libro Blanco de la Nutrición en España. FEN ed 2013, pg 47-54.
- Shen B, Jensen RC, Bohnert HJ. Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol*. 1997; 115(2): 527-532.
- Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol* 1999; 299: 152-178.
- Soder O. Isolation of interleukin-1 from human milk. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, 1987, 83(1):19-23.

- Soltys J, Quinn M. Selective recruitment of T-cell subsets to the udder during staphylococcal and streptococcal mastitis: analysis of lymphocyte subsets and adhesion molecule expression. *Infect Immun*. 1999; 67: 6.293-6.302.
- Song BJ, Jouni ZE, Ferruzzi MG. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation. *Nutrition*, 2013; 29:195-202.
- Stadtman ER, Berlett BS. Protein oxidation in ageing, disease, and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol*, 1997; 10: 485–494.
- Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003; 25: 207-218.
- Stafford I, Hernández J, Laibl V, Sheffield J, Roberts S, Wendel G. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among patients with puerperal mastitis requiring hospitalization. *Obstet Gynecol*. 2008; 112: 533-537.
- Stahl W, Schwarz W, Sies H. Human serum concentrations of all-trans beta- and alpha-carotene but not 9-cis beta-carotene increase upon ingestion of a natural isomer mixture obtained from *Dunaliella salina* (Betatene). *J Nutr*. 1993; 123(5): 847–51.
- Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, et al. Bioavail *Mol Aspects Med*, 2002; 23: 39-100.
- Steffen LM, Kroenke CH, Yu X, Pereira MA, Slattery ML, Van Horn L, et al. Associations of plant foods, dairy product, and meat intakes with 15 years incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr*, 2005; 82: 1169-1177.
- Strik, B. C.; Bristow, P.; Broaddus, A.; Davenport, J.; DeFrancesco, J. T.; English, M. y Vorsa, N. 2002. *Cranberry production in the Pacific Northwest*. Cooperative Extension of Washington State University, Oregon State University, University of Idaho and US Dept. of Agriculture.
- Svensk AM, Soini Y, Paakko P, Hiravikoski P, Kinnula VL. Difference expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2004; 122: 395-404.

- Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med.* 2012; 52(1): 46-58.
- Szlagatys-Sidorkiewicz A, Zagierski M, Jankowska A, et al. Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. *Early Hum Dev,* 2011; 88: 421–424.
- Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. *Trends Cell Biol,* 2005; 15: 319–326.
- Thomsen AC, Espersen T, Maigaard S. Course and treatment of milk stasis, noninfectious inflammation of the breast, and infectious mastitis in nursing women. *American Journal of Obstetrics and Gynecology,* 1984, 149(5):492-495.
- Thomsen AC, Mogensen SC, Love Jepsen F. Experimental mastitis in mice induced by coagulase-negative staphylococci isolated from cases of mastitis in nursing women. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1985; 64: 163-166.
- Thorberg BM, Kuhn I, Aarestrup FM, Brandstrom B, Jonsson P, Danielsson-Tham ML. Pheno- and genotyping of *Staphylococcus epidermidis* isolated from bovine milk and human skin. *Vet Microbiol.* 2006; 115: 163-172.
- Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med.* 1998; 24(9): 1477-84.
- Todoroki Y, Tsukahara H, Ohshima Y, Shukunami K, Nishijima K, Kotsuji F, Hata A, Kasuga K, Sekine K, Nakamura H, Yodoi J, Mayumi M. Concentrations of thioredoxin, a redox-regulating protein, in umbilical cord blood and breast milk. *Free Radic Res,* 2005; 39: 291-297.
- Tolbert NE, Essner E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol.* 1981; (3 Pt 2): 271s-283s.
- Tsai JH, Chen HW, Chen YH, Liu JY, Lii CK, “The protection of hepatocyte cells from the effects of oxidative stress by treatment with vitamin e in conjunction with DTT,” *Journal of Biomedicine and Biotechnology,* 2010; 2010: 486267. Epub 2010 May 18.
- Turoli D, Testolin G, Zanini R, Bellù R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Pediatr.* 2004 Dec;93(12):1569-74

- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J.* 1980; 191(2): 421-7.
- Valent F, Horvat M, Mazej D, Stibilj V, Barbone F. Maternal diet and selenium concentration in human milk from an Italian population. *J Epidemiol*, 2011; 21: 285-292.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004; 266(1-2): 37-56.
- Valsamakis G. causes of intrauterine growth restriction and postnatal development of metabolic síndrome. *Ann New York Academy Sci* 2006; 1092:138-147.
- Valls-Bellés V, Codoñer-Franch P, González San José ML, Muñiz Rodríguez P. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in Vitro e in vivo. Monografía. Madrid. ed. Centro de Cerveza y Salud. 2001.
- Valls-Bellés V, González P, Muñiz P. Epicatechin effect on oxidative damage induced by tert-BOOH in isolated hepatocytes of fasted rats. *Proc Biochem.* 2004; 39: 1525-1531.
- Valls Bellés V, Codoñer Franch P, González San José ML, Muñiz Rodríguez P. Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante "in vivo". Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud; 2005.
- Valls-Bellés V, Torres MC, Muñiz P, Beltran S, Martinez-Alvarez JR, Codoñer-Franch P. Defatted milled grape seed protects adriamycin-treated hepatocytes against oxidative damage. *Eur J Nutr*, 2006; 45: 251-258.
- Valls-Bellés V, Torres MC, Boix L, Muñiz P, Gonzalez-Sanjose ML, Codoñer-Franch P. alpha-Tocopherol, MDA-HNE and 8-OHdG levels in liver and heart mitochondria of adriamycin-treated rats fed with alcohol-free beer. *Toxicology*, 2008; 249: 97-101.
- Valls V, Codoñer, P. Efecto de la cerveza sin alcohol sobre la leche materna. Monografía. Editada por El Centro de Información Cerveza y Salud (Madrid), 2011
- Van Duyn MA, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruits and vegetables consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc*, 2000; 100: 1511-1521.

- Van Vleet JF, Boon GD, Ferrans VJ. Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in ducklings fed silver, copper, cobalt, tellurium, cadmium or zinc: protection by selenium or vitamin E supplements. *Am J Vet Res* 1981; 42:1206-1217.
- Varela-Moreiras G. Libro Blanco de la Nutrición en España (White Book on Nutrition in Spain) Spanish Foundation on Nutrition/Spanish Agency on Food Safety and Nutrition (AESAN, MSSI); Madrid, Spain: 2013.
- Varela-Moreiras G, Ruiz E, Valero T, Avila JM, del Pozo S. The Spanish diet: an update. *Nutr Hosp*. 2013 Sep;28 Suppl 5:13-20
- Vázquez CV, Rojas MG, Ramírez CA, Chávez-Servín JL, García-Gasca T, Ferriz Martínez RA, García OP, Rosado JL, López-Sabater CM, Castellote AI, Montemayor HM, de la Torre Carbot K. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *Food Chem*. 2015 Jun 1;176:480-6.
- Viduedo AFS, Leite JRC, Monteiro JCS, Reis MCG, Gomes-Sponholz FA. Severe lactational mastitis: particularities from admission. *Rev Bras Enferm*. 2015; 68(6):806-11.
- Vinson JA, Jang J, Yang J, Dabbagh Y, Liang X, Serry M, Proch J, Cai S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *J Ag Food Chem*, 1999; 47: 2502–2504.
- Viña J, Saez GT, Wiggins D, Roberts AF, Hems R, Krebs HA. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem J*, 1983; 212: 39-44.
- Vioque J, Weinbrenner T, Castelló A, Asensio L, Garcia de la Hera M. Intake of fruits and vegetables in relation to 10-year weight gain among Spanish adults. *Obesity (Silver Spring)*, 2008; 16: 664-670.
- Von Sonntag, C. Free-radical-induced DNA Damage and Its Repair, Ed: Springer-Verlag. Basel, 2006.
- Walker M. Mastitis. Lactation Consultant Series 2. La leche. Schaumburg: League International, 1999.

- Waly MI, Hornig M, Trivedi M, Hodson N, Kini R, Ohta A, Deth R. Prenatal and postnatal epigenetic programming: implications for GI, Immune, and neuronal function in autism. *Autism Research and Treatment*, 2012; 2012: 190930. Epub 2012, jun19.
- Wang Y, Lloyd B, Yang M, Davis CG, Lee SG, Lee W, et al. Impact of orange juice consumption on macronutrient and energy intakes and body composition in the US population. *Public Health Nutr*, 2012; 15: 2220-2227.
- Watts JL, Owen WE. Prevalence of staphylococcal species in four dairy herds. *Res Vet Sci*. 1989; 41: 1-4.
- Watts SD, Torres-Salazar D, Divito CB, Amara SG. "EAAT3 cysteine transport: potential mechanism of cysteine binding and translocation," in *Proceedings of the Society for Neuroscience Meeting*, November 2009.
- Wefers H, Sies H. Oxidation of glutathione by the superoxide radical to the disulfide and the sulfonate yielding singlet oxygen. *Eur J Biochem*. 1983; 137(1-2): 29-36.
- Weiss SJ, Lobuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest*. 1982; 47(1): 5-18.
- White DG, Harmon RJ, Matos JE, Langlois BE. Isolation and identification of coagulase-negative *Staphylococcus* species from bovine body sites and streak canals of nulliparous heifers. *J Dairy Sci*. 1989; 2: 1.886-1.892.
- White, B.L; Howard, L.R; Prior, R.L. Proximate and Polyphenolic Characterization of Cranberry Pomace. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58, 4030-4039
- Wilson R. Hydroxyl radicals and biological damage in vitro: what relevance in vivo?, in oxygen free radicals. *Excerpta* 1979,65 (C.F.S ed)pp19-35.
- Williamson G. Protective effects of fruits and vegetables in the diet. *Nutr Food, Sci* 1999; 1: 6-10.
- Willumsen JF, Filteau SM, Coutsooudis A, Uebel KE, Newell ML, Tomkins AM. Subclinical mastitis as a risk factor for mother-infant HIV transmission. *Adv Exp Med Biol*.2000; 478: 211-23.
- Wokcij KY, Rechtman DJ, Lee ML. Macronutrient analysis of a Nationwide Sample of Donor Breast Milk. *J Am Diet Assoc*, 2012; 109: 137-40.

- Wüst J, Rutsch M, Stocker S. Streptococcus pneumoniae as an agent of mastitis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 1995; 14: 156-157.
- Yahvah KM, Brooker SL, Williams JE, Settles M, McGuire MA, McGuire MK. Elevated dairy fat intake in lactating women alters milk lipid and fatty acids without detectible changes in expression of genes related to lipid uptake or synthesis. *Nutr Res* 2015 Mar;35(3):221-8.
- Yamada T, Hayasaka S, Shibata Y, Ojima T, Saegusa T, Gotoh T, Ishikawa S, Nakamura Y, Kayaba K. Frequency of Citrus Fruit Intake Is Associated With the Incidence of Cardiovascular Disease: The Jichi Medical School Cohort Study. *J Epidemiol*, 2011; 21: 169-175.
- Yao L, Friel JK, Suh M, Diehl-Jones WL. Antioxidant properties of breast milk in a novel in vitro digestion/enterocyte model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010 Jun;50(6):670-6.
- Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, 2001; 385: 20-27.
- Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*. 2001; 54(3): 176-86.
- Yuan Q, Zhu X, Sayre LM. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem Res Toxicol*. 2007; 20(1): 129-39.
- Zarban A, Taheri F, Chahkandi T, Sharifzadeh G, Khorashadizadeh M. Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk. *J Clin Biochem Nutr*. 2009 Sep;45(2):150-4.
- Zavaleta, N, Lanata, C, Butron, B, Peerson, J.M, Brown, K.H, Lönnnerdal, B. Effect of acute maternal infection on quantity and composition of breast milk. *Amer J Clin Nutr* 1995, 62(3): 559-563.
- Zeisel SH. Is maternal diet supplementation beneficial? Optimal development of infant depends on mother's diet. *Am j Clin Nut* 2009; 89: pp685S-687S.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med*. 2002; 33(3): 337-49.

Zhang CX, Ho SC, Chen YM, Fu JH, Cheng SZ, Lin FY. Greater vegetable and fruit intake is associated with a lower risk of breast cancer among Chinese women. *Int J Cancer*, 2009; 125(1): 181-188.

ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le invita a participar en un estudio sobre la lactancia materna titulado: “Efecto de los arándanos sobre el estado oxidativo de la leche en madres con mastitis”

La lactancia materna es el alimento diseñado por la naturaleza para la alimentación y crianza del bebé humano, sus propiedades únicas de especie, aseguran un desarrollo óptimo del niño y protegen la salud de la madre y de su hijo amamantado. En la actualidad se recomienda la alimentación del lactante con leche humana exclusiva hasta los 6 meses y complementada con otros alimentos hasta los 2 años o más. Los beneficios de la leche humana suponen que los lactantes amamantados se desarrollan con todo su potencial y alcanzan coeficientes intelectuales más altos que los no amamantados. Además padecen menos enfermedades no sólo durante el tiempo de amamantamiento sino años después, padeciendo menos enfermedades crónicas como la obesidad, la arterioesclerosis, la diabetes mellitus e incluso algunos tipos de cánceres. La madre que amamanta también protege su salud y previene enfermedades como el cáncer de mama, la hipertensión, la artritis reumatoide o la obesidad. Parte de estas propiedades beneficiosas se atribuyen a la capacidad antioxidante de la leche humana, pero los componentes específicos con esta capacidad antioxidante no son todavía bien conocidos. Por ello, un equipo de profesionales del Departamento de Salud de Castellón, en colaboración con el departamento de Medicina de la Universitat Jaume I y la Unidad de Lactancia Materna del Hospital Universitario Dr. Peset de Valencia han diseñado el estudio titulado: “Efecto de los arándanos sobre el estado oxidativo de la leche en madres con mastitis”. Este estudio tiene como objetivo comprobar si un suplemento nutricional como los arándanos es capaz de mejorar el balance oxidativo de la leche.

Para ello, se realizará el seguimiento de cuatro grupos de madres:

- **Grupo control:** madres sanas que alimentan a su hijo o hija con lactancia materna.
- **Grupo control + arándanos:** madres sanas, que alimentan a su hijo o hija con lactancia materna y, que acepten suplementar su dieta con 20 g de arándanos/día durante un periodo de 21 días.
- **Grupo mastitis:** madres con mastitis, que alimentan a su hijo o hija con lactancia materna.

- **Grupo mastitis + arándanos:** madres con mastitis, que alimentan a su hijo o hija con lactancia materna y que acepten suplementar su dieta con 20 g de arándanos/día durante un periodo de 21 días a partir de la detección del problema inflamatorio, junto con el tratamiento con antibióticos, en el caso que sea necesario prescribirlos.

Solicitamos su colaboración en este estudio y le pedimos que nos permita obtener 2 muestras leche de unos 15ml aproximadamente (al iniciar y al finalizar el estudio).

Si acepta participar en el estudio, usted será asignada a uno de los grupos anteriormente descritos, dependiendo de sus características clínicas. En el caso de ser asignada (esta selección se hará de forma aleatoria) a uno de los grupos suplementados con arándanos, solicitamos que acepte ingerir 20 g de arándanos diariamente durante 21 días. Se le proporcionará toda la ayuda necesaria para que usted pueda alimentar a su bebé con leche materna. La participación en el proyecto no conlleva ningún riesgo para su salud o la del lactante. Las muestras obtenidas durante el estudio se destinarán únicamente a los fines de investigación definidos en el mismo, y los datos que se le soliciten tendrán carácter estrictamente confidencial.

El proyecto **“Efecto de los arándanos sobre el estado oxidativo de la leche en madres con mastitis”** cumple con las características adecuadas referentes a información a los pacientes y cumplimiento de los criterios éticos para la investigación médica y biomédica establecidos en la Declaración de Helsinki (Junio 1964, Helsinki, Finlandia) de la Asamblea Médica Mundial y sus revisiones (Octubre 1975, Tokio, Japón), (Octubre 1983, Venecia, Italia), (Septiembre 1989, Hong Kong), (Octubre 1996, Somerset West, Sudáfrica), (Octubre 2000, Edinburgo), (Octubre 2008, Seúl, Corea) y (Octubre 2013, Fortaleza, Brasil) y en la Declaración Universal sobre el Genoma Humano y los Derechos del Hombre de la UNESCO y los acuerdos del Protocolo Adicional del Consejo de Europa para la protección de los Derechos del Hombre y de la dignidad del ser humano frente a las aplicaciones de la biología y de la medicina (París 12-01-1998, ratificado el 23-07-1999).

Su participación en el estudio es voluntaria y en el caso de decidir no participar esto no influirá en la atención que usted reciba. En cualquier caso, si necesita cualquier aclaración adicional o tiene alguna duda respecto al estudio puede contactar con la pediatra Amalia Nácher Fernández.

CONSENTIMIENTO INFORMADO-GENERAL

Tras haber leído la hoja de información al paciente y aclarado cualquier duda que les surja a usted o su pareja, si desea participar le agradeceremos firme la siguiente hoja de participación con consentimiento informado.

Título del estudio: **“Efecto de los arándanos sobre el estado oxidativo de la leche en madres con mastitis”**

Yo,..... (nombre y apellidos) he sido informada por la Dra. Amalia Nácher Fernández, colaboradora del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

- He leído la hoja de información que se me ha entregado.
- He podido hacer preguntas sobre el estudio.
- He recibido suficiente información sobre el estudio.
- Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo retirarme del estudio:
 - 1º- Cuando quiera
 - 2º- Sin tener que dar explicaciones
 - 3º- Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos
- Comprendo que todos mis datos serán tratados confidencialmente.
- He sido también informada de que nuestros datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Con esto, presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

Fecha: .../.../....

Fecha: .../.../....

Firma de la participante:

.....

Firma de la colaboradora

Amalia Nácher Fernández

ANEXO 2 . CEIC HOPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓN



INFORME COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ

Doña Georgina Queral Capdevila, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Castelló,

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica del HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ en su reunión del día 27 de abril de 2015, acta 4/2015, tras la valoración de la respuesta a un primer dictamen favorable condicionado del proyecto de investigación "Efecto de los arandanos sobre el estado oxidativo de la leche y el plasma en madres con mastitis".

Servicio: C.S. Benicasim

Investigador Principal: María Muriach Sauri/ Victoria Valls Bellés. Dpto Medicina, Facultad Cc. De la Salud. Universidad Jaume I.

Y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

1. Cuestiones relacionadas con la idoneidad del investigador y sus colaboradores.
2. Cuestiones relacionadas con la idoneidad de las instalaciones.
3. Cuestiones relacionadas con la idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y se consideran justificados los riesgos y las molestias previsibles para el sujeto.
4. Consideraciones generales del estudio.
5. Cumplimiento de la normativa de aplicación a las investigaciones clínicas con productos sanitarios a nivel estatal y autonómico.

EMITE UN INFORME FAVORABLE.

El Comité tanto en su composición como en los PNT cumple con las normas de BPC (CPMP/ICH/135/95) y con el Real Decreto 223/2004, y su composición actual es la siguiente:

Presidenta	D^a Amparo Barreda Aznar Farmacéutica Atención Primaria
Vicepresidente	D. Emilio Ibáñez Benages Farmacéutico Hospitalario
Secretaria	D^a Georgina Queral Capdevila Miembro ajeno a la profesión sanitaria.Licenciada en Derecho
Vocales	D^a Beatriz Sánchez-Peral Sánchez Miembro en calidad de Directora Médica. Facultativo Especialista en Medicina Familiar y Comunitaria. D. Juan Vicente Esplugues Mota Farmacólogo Clínico D. Raimundo García Boyero Facultativo especialista Hematología D^a Amparo Ferrandiz Selles Jefe de Servicio UCI

Avgda. Benicàssim, s/n 12004 Castelló - Tel. (+34) 964 7 26500 - Fax. (+34) 964 7 26645 --
www.castello.san.gva.es



D^a Pilar Mon Carro
 Diplomada en Enfermería
D. Guillermo Mena Pinilla
 Facultativo, Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
D. Antonió Palau Canos
 Facultativo Especialista Medicina Digestiva

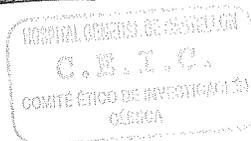
D^a Maria Esther Roselló Sastre
 Facultativo Especialista Anatomía Patológica
D. Mario Ferrer Vázquez
 Facultativo Especialista Pediatría
D^a Neus Rodríguez Bacardit
 Facultativo Especialista Medicina Familiar y Comunitaria
D^a José Alejandro Díaz Gutiérrez
 Miembro lego
D. Ismael García Costa
 Facultativo Especialista Traumatología
D^a Berta Claramonte Clausell
 Facultativo Especialista Neurología
D. José Vicente Castelló Carrascosa
 Facultativo Especialista Alergología
D. Carlos J. Soriano Navarro
 Facultativo Especialista Cardiología

Que en dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

Que en el caso de que se evalúe algún proyecto del que un miembro sea investigador/colaborador; éste se ausentará de la reunión durante la discusión del proyecto.

Lo que firmo en Castellón a 25 de enero de 2016

Fdo. Georgina Queral Capdevila
 Secretaria



ANEXO 3 . CEIC HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. PESET DE VALENCIA



A/A.: Cristina Abad
C/ Sant Miquel, 39
12179 Tirig (Castellón)

Dña. Pilar Codoñer Franch, Presidenta del Comité Ético de Investigación Clínica
del Hospital Universitario Dr. Peset.

CERTIFICA:

Que este comité en su reunión celebrada el día 27 de Abril de 2016 ha evaluado y ha aprobado el estudio titulado: **Efecto de los arándanos sobre el estado oxidativo de la leche en madres con mastitis.**
Proyecto de investigación. Tesis doctoral
Código Ceic: 23/16

Valencia 3 de Mayo de 2016

Fdo.: Pilar Codoñer Franch



CS/31

ANEXO 4. REGISTRO DIETÉTICO DE 24 HORAS

RECORDATORIO 24 HORAS

- Fecha correspondiente al día de recuerdo:
- Nombre:
- Edad:
- Sexo:
- Peso (kg):
- Talla (m):

Desperté a las

Me acosté

Hora en que se ingirió el alimento o bebida, dónde, con quién, ambiente emocional	Tipo de alimento o bebida ingerida, cantidad y método de preparación			Cuando proceda, hacer una lista de cualquier aspecto relacionado (actividad física, síntomas, etc.)
	Tipo de alimento o bebida	Cantidad consumida	Método de preparación (incluir todos los ingredientes)	

Hora en que se ingirió el alimento o bebida, dónde, con quién, ambiente emocional	Tipo de alimento o bebida ingerida, cantidad y método de preparación			Cuando proceda, hacer una lista de cualquier aspecto relacionado (actividad física, síntomas, etc.)
	Tipo de alimento o bebida	Cantidad consumida	Método de preparación (incluir todos los ingredientes)	

