

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA



*Influencia de los factores dietéticos maternos
durante la gestación en la calidad de la leche y su
repercusión en el recién nacido.*

TESIS DOCTORAL

Almudena Navarro Ruiz

Dirigida por:

Pilar Codoñer Franch

Marzo 2017.



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

PROGRAMA DE DOCTORADO DE PEDIATRÍA

FACULTAD DE MEDICINA

*Influencia de los factores dietéticos maternos
durante la gestación en la calidad de la leche y su
repercusión en el recién nacido.*

Tesis doctoral presentada por:

Almudena Navarro Ruiz

Dirigida por:

Pilar Codoñer Franch

Valencia, Marzo 2017

TESIS DOCTORAL

*Influencia de los factores dietéticos maternos
durante la gestación en la calidad de la leche y su
repercusión en el recién nacido.*

Tesis presentada para optar al grado de doctor de Dña. Almudena Navarro Ruiz, licenciada en Medicina y Cirugía, con DNI 24390610F.

Firmado: Almudena Navarro Ruiz

Directora: Pilar Codoñer Franch

Valencia, Marzo de 2017.

CERTIFICACIÓN

Dra. Pilar Codoñer Franch, Doctora en Medicina y Profesora Titular del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia.

CERTIFICA que:

Dña. Almudena Navarro Ruiz, licenciada en Medicina por la Universidad de Valencia, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Universidad de Valencia, el presente trabajo titulado “Influencia de los factores dietéticos maternos durante la gestación en la calidad de la leche y su repercusión en el recién nacido” y autoriza su presentación como Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste a los efectos oportunos y en cumplimiento con la legislación vigente, firma el presente certificado en Valencia 10 de marzo de 2017.

Dra. Pilar Codoñer Franch

AGRADECIMIENTOS

A todas las madres, y sus recién nacidos, que de una forma voluntaria y desinteresada han aceptado participar en nuestro estudio porque sin ellos no podría haberse llevado a cabo.

A Pilar, mi directora de tesis, por su perseverancia, por recordarme cada vez que nos veíamos cuándo iba a retomar mi tesis. Gracias a su impulso y ayuda he podido quitarme esta espinita y llegar hasta aquí.

Al personal del Hospital Doctor Peset y del Laboratorio Clínico del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina de Valencia que han participado en la extracción, transporte y procesado de las muestras; especialmente a enfermería y auxiliares de Maternidad por su amable colaboración pues ha supuesto una sobrecarga laboral a sus tareas habituales.

A mis compañeros de trabajo, por compartir conmigo estos duros meses, por su paciencia y empatía dándome ánimos a diario para alcanzar la meta propuesta.

A mis amigos, porque la vida no sólo es trabajar y, especialmente, a “mis olivas”, porque somos amigos desde que tengo memoria, hemos crecido juntos y nos queremos tal y como somos, por hacerme entender lo que significa la verdadera amistad.

A mi familia, porque sin ella mi vida no tendría sentido.

A mi madre, Pilar, por su amor incondicional, por estar siempre a mi lado y porque además de darme la vida, me enseña cada día a crecer como persona, inculcándome buenos valores y siendo para mí un gran ejemplo a seguir.

A mi padre, Antonio, por su amor y gran apoyo, por enseñarme a ver las cosas desde perspectivas diferentes, dándome ánimos para continuar el camino de la vida.

A mi hermano, Javier, mi cómplice, porque nos servimos de apoyo mutuo en todo momento y aunque la vida va pasando por múltiples etapas eso no hace otra cosa sino fortalecer nuestro afecto y unión.

A mis abuelos, especialmente a mi abuela Aurora, porque desde allá donde esté siento su energía protectora y sé que está superorgullosa de mí por lo que soy y he alcanzado tanto personal como profesionalmente.

A mi marido, Daniele, por ser mi compañero de viaje, por su amor eterno y apoyo, con el que es una delicia pasar todos los momentos importantes de nuestras vidas cogidos de la mano.

A mi hija, Elsa, por ser el motor de mi vida, de lo que más orgullosa me siento de haber hecho en este mundo y quien me enseña cada día lo que significa el amor verdadero. Yo te he dado la vida, pero mi vida eres tú. Gracias por hacerme poner cada día los pies en la tierra y recordarme la verdadera esencia de las cosas.

Y en general, a todas aquellas personas que directa o indirectamente han hecho posible la culminación de este trabajo, muchas gracias de corazón.

ÍNDICE

I. <u>RESUMEN</u>	26
II. <u>INTRODUCCIÓN</u>	31
1. LECHE HUMANA: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES	32
1.1 Lactogénesis	32
1.2 Composición de la leche materna.....	33
1.3 Componentes de la leche humana y propiedades	35
1.4 Situación especial: composición leche del prematuro.....	44
2. RELACIÓN LECHE MATERNA Y DIETA.....	45
2.1 Relación dieta materna y lípidos de la leche	46
2.2 Relación dieta materna e hidratos de carbono	50
2.3 Relación dieta materna y micronutrientes	50
3. FUNCIÓN ANTIOXIDANTE DE LOS ALIMENTOS.....	52
3.1 Introducción: metabolismo oxidativo.....	52
3.2 Clasificación de los antioxidantes	53
3.3 Antioxidantes dietéticos y sus acciones.....	57
3.4 Dieta mediterránea y estrés oxidativo	62
3.5 Otros patrones dietéticos	63
3.6 Vitaminas, minerales y estrés oxidativo	64
3.7 Efecto de polifenoles y carotenoides sobre estrés oxidativo	65
4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA	67
4.1 Introducción.....	67
4.2 Leche humana y estrés oxidativo	68
4.3 Propiedades de la leche materna.....	69
4.4 Antioxidantes no enzimáticos.....	70
4.5 Antioxidantes enzimáticos.....	74
4.6 Análisis capacidad antioxidante leche humana	76

5.	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	77
6.	HIPÓTESIS DE TRABAJO	79
7.	OBJETIVOS	80
III. <u>METODOLOGÍA</u>		82
1.	DISEÑO	83
1.1	Tipo de estudio	83
1.2	Población de estudio	83
1.3	Tamaño muestral	84
1.4	Requerimientos éticos	84
1.5	Seguimiento durante ingreso en Maternidad	85
1.6	Variables: independientes y dependientes	86
2.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	88
2.1	Muestras	88
2.2	Datos dietéticos	88
2.3	Métodos de análisis	90
2.3.1	Encuestas dietéticas.....	90
2.3.2	Análisis de laboratorio	90
2.3.3	Análisis estadístico.....	97
IV. <u>RESULTADOS</u>.....		99
1.	CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES	100
2.	PARÁMETROS BIOQUÍMICOS MATERNOS	100
3.	INGESTA DIETÉTICA MATERNA.....	102

4.	ESTADO OXIDATIVO (I): medición capacidad antioxidante	107
4.1	Capacidad antioxidante plasma materno	107
4.2	Contenido de antioxidantes en plasma materno	111
4.3	Evaluación daño oxidativo en la madre.....	112
4.4	Capacidad antioxidante total (CAT) de la leche.....	117
4.5	Contenido de antioxidantes en la leche	121
5.	ESTADO OXIDATIVO (II): relación con diferentes factores.....	125
5.1	Relación CAT leche con antropometría madre e hijo	125
5.2	Relación CAT leche con bioquímica materna.....	127
5.3	Relación CAT leche con macronutrientes dieta	132
5.4	Relación CAT leche con micronutrientes dieta (I): vitaminas	133
5.5	Relación CAT leche con micronutrientes dieta (II): minerales.....	135
5.6	Relación CAT leche con marcadores estrés oxidativo en plasma materno..	137
5.7	Relación CAT leche con marcadores estrés oxidativo en orina materna	138
5.8	Relación CAT leche y plasma maternos.....	139
V.	<u>CONCLUSIONES FINALES</u>	143
VI.	<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	147
VII.	<u>ANEXOS</u>	175

ABREVIATURAS

- ABTS: Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
- ADN: Ácido desoxirribonucleico
- AEG: Adecuado para la edad gestacional
- AGM: Ácidos Grasos Monoinsaturados
- AGP: Ácidos grasos poliinsaturados
- AGS: Ácidos grasos saturados
- Alfatoco: Alfatocoferol
- ARN: Ácido ribonucleico
- ATP: Adenosin trifosfato
- CAT: Capacidad antioxidante total
- DHA: Ácido docosahexaenoico
- DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidracil
- DS: Desviación estándar
- EDTA: Etilendiaminotetraacético
- EG: Edad gestacional
- FA: Fosfatasas alcalinas
- FRAP: Ferric reducing antioxidant power (capacidad antioxidante mediante reducción férrica)
- GC: Grupos carbonilo
- GGT: Gamma glutamil transpeptidasa
- Gluc: Glucosa
- GOT: Transaminasa glutámico oxalacética
- GPT: Transaminasa glutámico pirúvica
- Gpx: Glutación peroxidasa
- Gr: Glutación reductasa
- H₂O₂: Peróxido de hidrógeno
- HDL: High density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad)
- Ig: Inmunoglobulina
- IL: Interleukina
- IMC: Índice de masa corporal

- kDa: Kilodaltos
- LDL: Low density lipoprotein (lipoproteína baja densidad)
- LP: Lactoperoxidasa
- Máx: Máximo
- MDA: Malonaldehído
- Mín: Mínimo
- mOsm: Miliosmoles
- NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- OH⁸dg: 8-OH-2-deoxiguanosin
- ORAC: Oxygen radical absorbance capacity (capacidad de absorción de radicales de oxígeno)
- Panto: Pantoténico
- PG: Prostaglandina
- Porc: Porcentaje
- Prot.Tot: Proteínas totales
- RN: Recién nacido
- ROS: Reactive oxygen species (especies reactivas de oxígeno)
- Sig: Significación estadística
- SOD: Superóxido dismutasa
- TBARs: Thiobarbituric acid reactive substances (sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico)
- TG: Timidin glicol
- TNF: Factor de necrosis tumoral
- TOx Tiorredoxinas
- TPTZ: tripiridiltriazina
- UI: Unidades Internacionales
- Vit: Vitamina
- vol: Volumen
- vs: Versus
- VLDL: Very low density lipoprotein (lipoproteína de muy baja densidad)

ÍNDICE DE TABLAS

-Tabla 1: Características de las participantes del estudio	100
-Tabla 2: Parámetros bioquímicos en suero materno	101
-Tabla 3: Análisis de la dieta materna	104
-Tabla 4: Capacidad antioxidante plasma materno.....	109
-Tabla 5: Antioxidantes contenidos en plasma materno.....	112
-Tabla 6: Evaluación en sangre del daño oxidativo materno.....	116
-Tabla 7: Evaluación en orina del daño oxidativo materno.....	116
-Tabla 8: Capacidad antioxidante total (CAT) de la leche materna	118
-Tabla 9: Contenido de antioxidantes en la leche humana	123
-Tabla 10: Relación entre CAT leche y antropometría materna.....	125
-Tabla 11: Relación entre CAT leche y otro datos de interés.....	125
-Tabla 12: Relación entre CAT leche y bioquímica materna (I)	127
-Tabla 13: Relación entre CAT leche y bioquímica materna (II).....	128
-Tabla 14: Relación entre CAT leche y bioquímica materna (III)	128
-Tabla 15: Relación entre CAT leche y macronutrientes dieta (I)	132
-Tabla 16: Relación entre CAT leche y macronutrientes dieta (II)	132
-Tabla 17: Relación entre CAT leche y macronutrientes dieta (III).....	133
-Tabla 18: Relación entre CAT leche y vitaminas dieta (I).....	134
-Tabla 19: Relación entre CAT leche y vitaminas dieta (II)	134
-Tabla 20: Relación entre CAT leche y vitaminas dieta (III)	134
-Tabla 21: Relación entre CAT leche y minerales (I)	135
-Tabla 22: Relación entre CAT leche y minerales (II)	135
-Tabla 23: Relación CAT leche con marcadores daño oxidativo plasma (I).....	137
-Tabla 24: Relación CAT leche con marcadores daño oxidativo plasma (II)	138
-Tabla 25: Relación CAT leche con marcadores daño oxidativo orina materna.....	139
-Tabla 26: Relación CAT leche y plasma materno.....	140

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Reducción del reactivo FRAP	91
- Figura 2: Estructura química del DPPH.....	92
- Figura 3: Estructura química del ABTS y del radical ABTS*	93
- Figura 4: Dieta materna según proporción de macronutrientes	103
- Figura 5: Correlación entre CAT leche humana por ABTS vs DPPH	121
- Figura 6: Correlación CAT leche (FRAP) con peso recién nacido.....	126
- Figura 7: Correlación CAT leche materna (ABTS) con plasma (FRAP)	140
- Figura 8: Correlación CAT plasma y leche maternos por ABTS	141

RESUMEN

La evidencia científica avala la superioridad nutricional de la leche materna (especificidad de nutrientes, máxima biodisponibilidad, aporte de células vivas: linfocitos y macrófagos, enzimas digestivas, inmunomoduladores, factores de crecimiento y receptores análogos) para la alimentación del recién nacido y lactante. Asimismo, el amamantamiento comporta grandes beneficios no sólo para la salud de los lactantes, sino también para la salud de sus madres y para la sociedad en general.

Por un lado, el adecuado estado nutricional materno tanto preconcepcional como durante la gestación y en la etapa postnatal es fundamental por su influencia en la modulación genética placentaria y su relación con obesidad, diabetes y otras enfermedades crónicas no transmisibles en la edad adulta. Por otro lado, hay múltiples evidencias respecto a que la composición de la leche materna presenta algunas modificaciones regionales, fundamentalmente de ciertas proteínas, vitaminas y minerales, posiblemente en relación con diferencias dietéticas.

La leche humana contiene moléculas eliminadoras de radicales libres y múltiples componentes inmunomoduladores pero todavía no se han descrito todas las sustancias presentes ni tampoco las diferentes funciones de las mismas. Todo ello, junto con el hecho de que estas sustancias son producidas “*de novo*” en la glándula mamaria o son elementos provenientes del plasma materno, justifica la importancia de este estudio cuyo **objetivo principal** fue la evaluación de la influencia de la nutrición de la gestante sobre la calidad de su leche y su repercusión en el recién nacido. Como **objetivos específicos** se plantearon: analizar el estado nutricional materno y su posible relación con parámetros analíticos maternos, evaluar la calidad y contenido de la dieta de las mujeres lactantes, determinar su perfil oxidativo y valorar la capacidad antioxidante así como antioxidantes específicos (polifenoles y coenzima Q) de la leche humana y sus modificaciones en relación a las variaciones de la dieta materna.

Respecto a la **metodología**, completaron finalmente el estudio un total de 90 mujeres, todas ellas madres sanas cuyo parto había tenido lugar en la Maternidad del Hospital Dr. Peset de Valencia, cumpliendo los criterios de inclusión y tras firmar el consentimiento informado. Antes de iniciarse el estudio, fue presentado y aprobado por el Comité de Ética e Investigación del departamento Dr. Peset.

Durante su hospitalización se recogieron los datos antropométricos de la madre y del recién nacido, recordatorio de 24 horas de la dieta materna así como registro prospectivo dietético durante 3 días. Se obtuvieron muestras de leche, sangre y orina maternas que fueron remitidas al Laboratorio Clínico del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina donde fueron procesadas. Se llevó a cabo la determinación de la capacidad antioxidante total a nivel de plasma y leche maternos mediante los 3 métodos de análisis más ampliamente extendidos, que son FRAP, DPPH y ABTS. También se analizó el contenido de marcadores de daño oxidativo en plasma y orina maternos para averiguar su posible relación con su contenido en leche materna y por tanto su repercusión posterior en el recién nacido. Y finalmente se realizó el análisis de la capacidad antioxidante total de la leche materna en relación a todos los anteriores parámetros analizados: antropometría madre e hijo, composición de la dieta diferenciando entre macro y micronutrientes y metabolismo oxidativo en plasma y orina maternos.

En cuanto a los **resultados** destaca la presencia de ferropenia en un 40% de las participantes así como hiperlipemia, encontrándose el resto de valores en rango de normalidad. Al analizar la dieta materna se aprecia que dentro de los macronutrientes el aporte proteico fue similar al recomendado, pero presentaron exceso de grasas y un déficit de hidratos de carbono. Y respecto a los micronutrientes, hay un bajo consumo de hierro, cobre, ácido fólico y yodo, y consumo excesivo de sodio. Los valores obtenidos de capacidad antioxidante total (CAT) en plasma materno mediante el método ABTS fue muy superior al de otros estudios reportados probablemente influenciados por múltiples factores como la menor edad de nuestras participantes y sobre todo por la dieta mediterránea al ser ésta más rica en antioxidantes. Se ha mostrado que a menor peso del recién nacido, mayor es la capacidad antioxidante de la leche materna medida con el método FRAP. Se ha obtenido significación estadística al correlacionar la CAT de la leche con los niveles bioquímicos maternos, siendo directamente proporcional en el caso del hierro e inversamente con el VLDL colesterol. Y al correlacionarla con la dieta materna, es proporcional a los niveles de vitaminas A, B6, C, fólico, hierro, magnesio y cobre e inversa al contenido de grasas e hidratos de carbono. Finalmente, se

aprecia una relación inversamente proporcional entre la CAT de la leche y del plasma materno.

A modo de **conclusiones** hay que comentar que las madres gestantes han mostrado una dieta desequilibrada con exceso de grasas a costa de un déficit de hidratos de carbono. La ferropenia es la carencia nutricional más frecuente en el embarazo. Cuanto menor es el peso al nacer, mayor es la capacidad antioxidante de la leche materna. La CAT de la leche materna es directamente proporcional al nivel de hierro plasmático e inversamente proporcional al de VLDL colesterol. Y para concluir, cuanto mayor es el daño oxidativo materno, mayor es la capacidad antioxidante de su leche.

INTRODUCCIÓN

1. LECHE HUMANA: COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES

La leche materna es el alimento idóneo para el recién nacido. Se caracteriza por presentar una gran complejidad biológica. Los componentes que la constituyen (hormonas, factores de crecimiento, enzimas, nutrientes, etc.) le confieren la idoneidad para que un niño sea alimentado con ella de forma exclusiva los primeros 6 meses de vida. De hecho, la Organización Mundial de la Salud recomienda la leche materna hasta los 2 años de edad incluso tras haber introducido la alimentación complementaria dados sus grandes beneficios. Contiene todos los elementos indispensables para el recién nacido, es una fuente importante de nutrientes además de otorgarle protección frente a infecciones (Prentice *et al.*, 1996).

1.1 LACTOGÉNESIS

Antes de profundizar en la composición de la leche materna, se debe recordar que se han descrito dos periodos de la producción de leche. El primero se iniciaría a partir del 6º mes de gestación hasta los 2-3 primeros días postparto. Los niveles de prolactina, progesterona y estrógenos se encuentran elevados. La secreción láctea es escasa pero rica en proteínas, células y sodio. El segundo periodo abarca desde el 3º día postparto hasta que finalice la lactancia. Está regulado por el aumento de prolactina y oxitocina y por el descenso de estrógenos y progesterona (Wide *et al.*, 2005).

Respecto al volumen de leche, a partir del 3^{er} día tras el parto aumenta de forma progresiva con un promedio de 800 ml al día aunque dicha cifra es muy variable y puede ir desde los 500 a los 1000 ml. Ello depende fundamentalmente de la succión del propio lactante ya que será esto lo que dará lugar a la estimulación hormonal necesaria para mantener la lactancia. Hay una serie de factores que se han relacionado con diferencias en la producción de volumen (Neville, 1995): cantidad de tejido glandular mamario, estado nutricional, ingesta calórica y talla materna y tabaquismo.

1.2 COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA

La composición de la leche humana es muy dinámica, sufre modificaciones de una madre a otra y también dentro de cada mujer según la etapa de la lactancia, según el momento del día y dentro de la misma toma. Dichos cambios obedecen a mecanismos de regulación neuroendocrina (Lönnnerdal, 2003). La fracción más estable es la proteica y la de mayor variabilidad, la grasa. Su composición es compleja y contiene cantidades variables de los diferentes nutrientes. Hay múltiples asociaciones entre las características maternas y la composición de la leche. En cambio, la composición de macronutrientes es independiente de la dieta materna y de las medidas antropométricas de la madre. Los principales macronutrientes de la leche son: lactosa, grasas incluyendo triglicéridos, colesterol, fosfolípidos y hormonas esteroideas, proteínas (caseína, alfa-lactoalbúmina, lactoferrina, IgA secretora) y minerales como sodio, potasio, calcio y magnesio.

Como se ha comentado, la composición de la leche materna varía según la etapa en la que se encuentre la lactancia, y clásicamente se habla de 3 tipos según su diferente composición láctea que tendrá lugar en las primeras semanas de lactancia: calostro, leche de transición y leche madura.

1) Calostro

Es producido por la glándula mamaria los primeros días posparto, más precoz habitualmente si se trata de una mujer múltipara. Tiene una consistencia pegajosa y es de color amarillento por la presencia de β -carotenos lo que a su vez le dota de propiedades antioxidantes.

Su volumen es variable, oscilando de 2 a 20 ml/día en los tres primeros días; a medida que el bebé succiona, aumenta hasta 580 ml/día hacia el sexto día. Esta cantidad es suficiente para cubrir las necesidades del recién nacido los primeros días de vida. Y su aporte calórico medio es de 68 kcalorías/100 ml (Lawrence y Pane, 2007).

Tiene mayor cantidad de proteínas (97% en forma de inmunoglobulina A), vitaminas liposolubles, lactoferrina, linfocitos, macrófagos, factor de crecimiento,

lactobacilos Bifidus, sodio y zinc que la leche madura. En concentraciones menores se encuentran las grasas, la lactosa y las vitaminas hidrosolubles (Aguilar, 2005).

Además de su importante valor nutricional, tiene un papel defensivo fundamental al proteger al neonato contra infecciones y alergias ya que transfiere inmunidad pasiva al recién nacido por absorción intestinal de inmunoglobulinas; además, contiene 2000 a 4000 linfocitos/mm³ y altas concentraciones de lisozima.

Destaca por poseer gran cantidad de flora bifidógena que colonizará el intestino neonatal y junto con los prebióticos evitarán la adherencia de microorganismos patógenos a ese nivel (Uruakpa et al., 2002). Tiene efectos laxantes que ayudan a la expulsión del meconio debido a que contiene motilina disminuyendo así el riesgo de hiperbilirrubinemia del recién nacido.

2) Leche de transición

Su producción comienza después del calostro, habitualmente del 4° al 15° día postparto y suele durar de cinco a diez días. Es de color blanco debido a la emulsificación de grasas y a la presencia de caseinato cálcico (Wellstart, 2009). Su composición irá presentando modificaciones de forma progresiva, de ahí su nombre (Reyes, 2011).

- Se eleva su concentración de agua, lactosa y grasas, por aumento de colesterol y fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles.
- Disminuyen las proteínas, las inmunoglobulinas y las vitaminas liposolubles debido a que se diluyen por el incremento en el volumen de producción, que puede alcanzar 660 ml/día hacia el día 15 postparto.

3) Leche madura

Se inicia su producción a partir del 15° día tras el parto y se prolonga durante el resto de la lactancia. Su volumen promedio es de 750 cm³/día aunque podría llegar a duplicarse en el caso de embarazos múltiples. A continuación se detallan sus componentes.

1.3 COMPONENTES DE LA LECHE HUMANA Y PROPIEDADES

Las variaciones en la composición de macronutrientes son mínimas en los carbohidratos, aproximadamente un 10% en las proteínas y un 30% en los lípidos de la leche materna (Mena y Milad, 1998). Respecto a los micronutrientes, el zinc, yodo y flúor son dependientes de la dieta. Los minerales como sodio, potasio, calcio o fósforo no suelen depender de la dieta en condiciones habituales.

- **Energía:** la leche humana aporta aproximadamente de 670 a 700 kcal por litro y lo realiza en su mayoría a base de los hidratos de carbono y las grasas.
- **Osmolaridad:** es mucho menor comparándose con las leches de fórmula, oscilando de 287 a 293 mOsm frente a los 350 mOsm de la leche artificial.
- **Agua:** supone el 87 % del total de sus componentes, supliendo así por completo las necesidades del lactante sin precisar ningún otro líquido adicional (Aguilar, 2005).
- **Hidratos de carbono:** el principal es la lactosa, que se sintetiza en la glándula mamaria a partir de la glucosa. Tiene entre sus funciones favorecer el desarrollo de la flora intestinal gracias a las Bifidobacterias e impide el crecimiento de microorganismos patógenos por ser acidificante; asimismo mejora la absorción de calcio y mantiene estable la osmolaridad de la leche porque conserva bajas concentraciones de sodio y potasio (Kunz et al., 2000). Un sustrato de la lactosa es la galactosa, que es indispensable en la formación de galactopéptidos y galactolípidos cerebrósidos en el sistema nervioso central. Existen también en la leche oligosacáridos, los que representan el tercer componente mayoritario de la leche tras la lactosa y la grasa. Debido a su estructura, que es similar a la de ciertos receptores de membrana de las mucosas gastrointestinal y retrofaríngea, son capaces de actuar como ligandos competitivos frente a microorganismos patógenos; de esta manera, evitan su unión a receptores presentes en las mucosas, protegiendo al lactante de infecciones intestinales y de las vías aéreas superiores (Gudiel-Urgano y Goñi, 2001).

- **Grasas:** Las grasas presentes en la leche materna, representan una importante fuente de energía para el bebé y aportan aproximadamente el 50% de las calorías totales. Son fuente de ácidos grasos esenciales y vehículo de las vitaminas liposolubles, cuya absorción favorecen. Realizan un aporte balanceado de ácidos grasos omega 3 y omega 6, importante para lograr una síntesis equilibrada de eicosanoides.

Su volumen es muy variable y puede ir de 1 hasta 7 g/dl. Hay tres variables que modifican las concentraciones de grasas en la leche humana, entre ellas la dieta materna es una de ellas (Jensen, 1996).

1. Momento del día: se incrementa su concentración por la tarde.
2. Momento de la toma: tras 10 minutos de iniciar la succión se irá incrementando progresivamente la cantidad de grasa desde 2% inicial hasta 6% que sería lo óptimo.
3. Variaciones individuales: si la madre ingiere grasas de forma adecuada ello garantizará unos niveles óptimos en la leche. Además, a mayor ganancia de peso de la madre durante la gestación, mayor cantidad de grasa en la leche materna. Y finalmente, a mayor volumen de leche producida menor concentración de grasa contendrá (Reyes, 2011).

En enfermedades maternas que afecten al transporte lipídico, como por ejemplo la abetalipoproteinemia, fibrosis quística o diabetes, se disminuirá de forma significativa el contenido total de lípidos (Hamosh y Bitman, 1992).

No existe una relación constante entre el volumen de leche y la concentración de grasa de la leche humana. Así puede haber un volumen bajo y una concentración alta o viceversa. Para una misma madre, el estímulo de la prolactina a través del vaciamiento mamario dará un aumento del volumen lácteo y algo de la concentración lipídica pues dicha hormona estimula directamente la actividad de la lipasa lipoproteica para captar ácidos grasos al epitelio mamario.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que el contenido energético total de la leche materna viene determinado por la concentración de grasa y el volumen

total de leche lo cual a su vez será regulado por el propio lactante en función del número de tomas y la duración de las mismas (Tyson et al., 1992).

La leche humana aporta ácidos grasos “indispensables” ya que no pueden ser sintetizados de novo por el ser humano y deben provenir de la dieta de la madre.

Se trata de ácidos grasos de cadena larga cuyos precursores son el ácido linolénico ($\omega 3$) y el ácido linoléico ($\omega 6$). Estos ácidos grasos se convierten en ácidos grasos poliinsaturados (LC-PUFA) tales como el ácido docosahexaenoico (DHA) vital en el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensorial, perceptual y cognitivo del lactante; y el ácido araquidónico, útil como sustrato para la síntesis de eicosanoides como las prostaglandinas, los leucotrienos y tromboxanos, que serían moduladores de las respuestas inflamatoria e inmune. Contiene también cifras elevadas de colesterol, que es fundamental en la proliferación neuronal y en la mielinización de las células gliales (Demmers et al., 2005).

Los lípidos son excretados en forma de unos “glóbulos” cuya membrana está formada por una capa de colesterol y lípidos complejos y su interior por triglicéridos. Durante la lactancia aumenta la concentración de triglicéridos y disminuye la de colesterol y fosfolípidos a medida que aumenta el tamaño de dichos glóbulos.

La concentración de lípidos excretados en la leche humana dependerá por un lado, de las características de la glándula mamaria y, por otro lado, de la estimulación de la lipasa lipoproteica (enzima que facilita la digestión de las grasas por parte del lactante) por la prolactina. Al contrario ocurre con la composición de triglicéridos ya que está determinada por la dieta materna tanto durante la gestación como durante la lactancia. Ello establecerá la composición de ácidos grasos de los triglicéridos de la leche (Mena y Milad, 1998).

Si la madre sigue una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados, ello dará lugar a un mayor contenido de éstos en la leche. Mientras que si la madre sigue una dieta en la que predominan los carbohidratos sobre los lípidos, se producirá

una síntesis de novo de ácidos grasos en la glándula lo que a su vez producirá un aumento de la concentración de ácidos grasos saturados de cadena media.

El contenido de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga es menos variable que el de sus precursores. Ello es muy importante pues son esenciales en el desarrollo visual y cognitivo, sobre todo en el prematuro.

Por tanto, como la composición de los ácidos grasos en general sí que parece ser modificable por las variaciones dietéticas, se ha propuesto mejorar la absorción lipídica del lactante aumentando el contenido de ácidos grasos de cadena media en la leche materna a través de una dieta rica en hidratos de carbono y pobre en lípidos o mediante la suplementación de ácidos grasos $\omega 3$ para producir un leche con mayor contenido en DHA.

- **Proteínas:** el contenido de proteínas en la leche humana oscila entre 8.2 y 9 g/l (Feng et al., 2009). Su concentración va disminuyendo a medida que avanza la lactancia y es independiente de la ingesta proteica materna.

Dependiendo del tipo de parto se modifica asimismo los niveles de proteínas en el calostro siendo menor en las que fue cesárea comparadas con parto vaginal, aunque las mayores diferencias no se obtuvieron en cuanto a la cantidad proteica sino más bien en el tipo de proteína. Por el contrario, el tipo de parto no influía en los niveles de grasa de la leche materna.

El tipo de proteínas que contiene la leche materna es único por ser las de mayor biodisponibilidad debido a que contienen enzimas digestivas como por ejemplo la amilasa.

En la leche materna hay dos fracciones nitrogenadas: la correspondiente al nitrógeno proteico (75%) y la del no proteico (25%) que incluye urea, creatinina, creatina, ácido úrico, aminoácidos libres y amoníaco y, en menores cantidades, poliaminas, hormonas, factores de crecimiento, nucleótidos cíclicos y oligosacáridos que contienen nitrógeno.

La primera fracción, la de nitrógeno proteico, se divide a su vez en dos subgrupos: proteínas del suero y caseína (Lönnerdal, 1996).

Dentro de las proteínas del suero, 37%, la alfa-lactoalbúmina es la más abundante y destaca por actuar como cofactor en la biosíntesis de lactosa y por su baja alergenicidad ya que su peso molecular es bajo, 14500 Da. En el calostro la cantidad de lactoalbúmina es más alta, alcanzando proporciones de 90:10 respecto a la caseína. A medida que la leche va madurando dicho proporción baja hasta alcanzar 50:50 (Lien, 2003).

Por otro lado, la lactoferrina, 27%, se une al hierro mejorando su transporte y absorción. Como en la leche humana predomina en estado no saturado, en el tracto intestinal del bebé compite con algunas bacterias por el hierro, de manera que los microorganismos no disponen de él para su proliferación y ejerce un efecto bacteriostático, en sinergismo con la IgA secretoria.

Recientemente se ha determinado que puede tener efecto bactericida al interaccionar con las paredes de los microorganismos, desestabilizándolas y causando su muerte. Así la lactoferrina puede desempeñar un papel esencial en la protección del recién nacido ante infecciones gastrointestinales.

La lactoferrina se encuentra en cantidades muy elevadas en el calostro, pero aunque desciende posteriormente, su presencia se mantiene a lo largo de toda la lactancia. En la leche de vaca la cantidad es diez veces inferior a la existente en la leche humana (Lönnerdal, 2003).

El otro grupo de proteínas, el constituido por la caseína, que en los últimos años se ha planteado que los fragmentos de ésta obtenidos de la digestión enzimática estimularían el sistema inmunológico del lactante. También se le han asignado roles relacionados con la absorción de iones calcio y actividades antitrombóticas, antihipertensivas y opioides (López, 2007).

Las proteínas de la dieta materna no parecen influir en la producción mamaria de lactoalbúmina ni caseína. Pero su aumento en la dieta sí puede producir aumento del nitrógeno no proteico y de los aminoácidos libres, aunque su relevancia clínica aún está por determinar.

Dentro de las propiedades inmunoprotectoras de la leche materna destacaría el papel de la inmunoglobulina IgA secretora. Se sintetiza en la glándula mamaria

y su función es la de formar anticuerpos capaces de unirse a virus y bacterias, impidiendo la penetración en la mucosa intestinal. Ello se logra gracias a su resistencia a la proteólisis y su estabilidad a pH bajo.

Otra función muy importante de la IgA secretoria es el bloqueo de la adhesión de patógenos al epitelio intestinal y la unión a sus toxinas. La leche materna presenta en su composición anticuerpos específicos contra antígenos ambiental a los que el neonato está potencialmente expuesto (Hosea et al., 2008).

La relación proteínas del suero/caseína va oscilando durante la lactancia siendo 90/10 los primeros diez días, hasta ser 50/50 a partir del noveno mes de lactancia hasta el final de la misma (Kunz y Lönnerdal, 1992).

Dentro de los compuestos nitrogenados no proteicos de la leche se encuentran los aminoácidos, de los que destacan:

- Taurina: favorece el desarrollo del sistema nervioso central así como la digestión de grasas interviniendo en la conjugación de ácidos biliares.
- Carnitina: es necesaria para la oxidación de lípidos en la mitocondria del cerebro.
- Ácido glutámico, cistina y glutamina: actúan como neuromoduladores y neurotransmisores.
- Nucleótidos: han cobrado gran importancia en los últimos tiempos, se les atribuyen diversas funciones tales como actuar de inmunomoduladores, promotores de las bifidobacterias a nivel de la flora intestinal y también mejorarían la maduración y proliferación gastrointestinal (Lönnerdal, 2003).
- **Vitaminas:** la leche materna contiene niveles óptimos de las vitaminas hidrosolubles, siendo la vitamina C y la niacina las más abundantes.

La principal acción de la vitamina C es la de agente antioxidante y reductor; como cofactor en reacciones enzimáticas que intervienen en el normal desarrollo del cartílago y el hueso. Además, estimula la absorción del hierro y actúa en el metabolismo de los depósitos de este mineral.

Respecto a las liposolubles, los mayores niveles se encuentran de vitamina E y beta-carotenos. La grasa de la leche actúa como vehículo de estas vitaminas.

La **vitamina D** se considera una parathormona, con funciones hematopoyéticas y propiedades inmunoreguladoras. Juega un papel importante en la mineralización ósea dado que incrementa la absorción intestinal de calcio y fósforo y la reabsorción renal de calcio. Cuando por razones climáticas, geográficas o culturales no se recibe la influencia de los rayos solares, se hace necesario su aporte diario. De hecho, actualmente se recomienda iniciar suplemento de 400 UI/ día a todo recién nacido y proseguirlo durante la época de lactante (Taylor et al, 2008).

La **vitamina K** siempre es escasa, encontrándose en la leche materna una concentración de 2 µg/l frente a los 12 µg/día requeridos por el lactante. Sus niveles no dependen de la suplementación materna. Está relacionada con el proceso de coagulación sanguínea. Como prevención de déficit por diferentes causas se recomienda administrar 1 mg de vitamina K intramuscular en dosis única a todo recién nacido en el momento del nacimiento evitando así enfermedad hemorrágica hasta la estabilización de la flora intestinal (Greer, 1999).

La **vitamina E** se encuentra en mayor concentración en la leche materna que en la de vaca. Esto resulta ventajoso en función de su capacidad antioxidante, si se tiene en cuenta la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de la leche humana.

La **vitamina A** interviene en el proceso de la visión y es necesaria para el crecimiento normal, la reproducción, el desarrollo fetal y la respuesta inmunológica. Su concentración en la leche humana es variable, ya que depende de la ingesta materna (Canfield et al., 1995).

- **Minerales:** la concentración de éstos en la leche materna está adaptada a los requerimientos nutricionales y a la capacidad metabólica del niño. Si se compara con las fórmulas infantiles, la leche humana presenta mayor biodisponibilidad de minerales, especialmente de calcio, magnesio, hierro,

cobre y zinc. Los minerales están en su mayoría ligados a las proteínas del suero, al citrato o a la membrana proteica del glóbulo de grasa lo que justifica su mejor absorción.

En general, el aporte global de minerales es bajo, lo que favorece el funcionamiento renal del lactante (Macías et al., 2006). La concentración de sodio, potasio y cloro es un tercio respecto a la leche de vaca, permitiendo así al niño a conservar agua indispensable para otras funciones como control térmico.

Entre los minerales, destaca el **hierro**. Además de ser esencial para la producción de glóbulos rojos y el transporte de oxígeno, también interviene en el desarrollo cognitivo. Se encuentra en niveles muy bajos en la leche materna, pero tiene una elevada biodisponibilidad. Sus concentraciones se reducen a lo largo de la lactancia hasta mantenerse estable a los seis meses. Se absorbe entre 45 y 75% de su contenido total, mientras que la leche de vaca sólo es de 10-30% debido a que hasta un 80% se encuentra unido a las seroproteínas y no tanto a la caseína en el caso de la leche materna (Lozzof et al., 1991).

El **calcio** es un micronutriente importantísimo puesto que forma parte del esqueleto: el 99 % del calcio corporal está presente en huesos y dientes en forma de fosfato cálcico, lo que les otorga dureza y estructura. El 1% restante se encuentra en líquidos extracelulares y membranas celulares. Es responsable de múltiples funciones de regulación metabólica.

El **fósforo** es un nutriente esencial por su participación en diversas funciones biológicas. En la leche humana, un 23% se halla ligado a proteínas, 15% está en forma de fósforo inorgánico y el resto unido a lípidos. Su concentración es menor que en leche de vaca. Su exceso puede contribuir a desestabilizar los niveles de calcio plasmático con el riesgo de hipocalcemia que ello supone y puede llegar a desencadenar una tetania neonatal (Abrams, 2006).

La **relación calcio/fósforo** en la leche materna es de 2 a 1 lo que se relaciona con la elevada absorción del calcio de hasta el 75% comparado con la fórmula artificial que apenas es del 20%.

El **cobre** es un mineral requerido para la utilización del hierro y cofactor de enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa y en la síntesis de hemoglobina, tejido conectivo y fosfolípidos. A pesar de que la concentración de cobre en la leche materna es baja, es raro encontrar deficiencia en niños con lactancia materna exclusiva dado que su absorción es del 25% frente al 18 % de la leche de vaca.

- **Oligoelementos:** el **flúor**, a pesar de su escasa presencia en la leche materna es útil en la prevención de las caries pues los niños alimentados con pecho tienen menos que los que tomaron fórmula.

El **magnesio** está en equilibrio con el calcio jugando un papel importante en la prevención de la hipocalcemia del recién nacido.

El **zinc** es un mineral esencial para el crecimiento y desarrollo del niño, está involucrado en el normal desarrollo del sistema inmunológico y en otros procesos fisiológicos, forma parte de algunas hormonas, además de ser cofactor de enzimas que intervienen en procesos metabólicos (Casey et al., 1995). Su distribución cambia a lo largo de la lactancia, en la leche madura un 30% se encuentra ligado a los lípidos (principalmente en la membrana del glóbulo de grasa), 20% a la caseína y el 50% restante, a componentes presentes en el suero lácteo. Se encuentra en niveles de 2 a 4 $\mu\text{g/ml}$ en la leche materna, muy inferior a la leche de vaca, pero destaca por tener gran biodisponibilidad.

Se ha visto que el aumento en la ingesta dietética materna de zinc podría modificar el contenido de éste en la leche si la dieta era previamente deficitaria. Por otro lado, hay madres cuya secreción láctea de zinc es anormalmente baja y en ese caso no responden al suplemento dietético. Ello es clínicamente evidente en los prematuros pues tienen proporcionalmente más requerimiento que el nacido a término (Lönnerdal y Kelleher, 2009).

A modo de resumen de los posibles efectos en la leche materna según diferentes factores dietéticos maternos se describen:

- Menor aporte de energía: menor volumen de leche.
- Mayor ingesta proteica: mayor contenido en nitrógeno no proteico.
- Dieta rica en hidratos de carbono: aumento de ácidos grasos de cadena media en la leche materna.
- Dieta rica en lípidos saturados: aumento de éstos en la leche.
- Dieta rica en poliinsaturados: aumento de éstos en la leche.
- Menor ingesta de zinc, iodo y flúor: menor concentración en la leche.
- Menor ingesta de vitaminas hidrosolubles: menor contenido en la leche.
- Tabaquismo: menor volumen de leche.

1.4 SITUACIÓN ESPECIAL: COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA DEL PREMATURO

La composición de la leche materna es diferente entre madres de niños a término o pretérmino. La diferencia más destacable y constante en los prematuros es un mayor contenido en sodio y proteínas, se cree que es debido a las diferencias en el control hormonal así como en la maduración de la propia glándula (Shaler, 2005). Dicha diferencia supone como es de esperar grandes beneficios para el prematuro.

Pero a partir de las 4 semanas aproximadamente, la leche materna no es suficiente para cubrir las recomendaciones en proteínas de recién nacidos de muy bajo peso (menor de 1500 g) y los aportes de calcio y fósforo suelen ser insuficientes para los elevados requerimientos de estos niños. Por ello se recomienda suplementar la dieta materna con proteínas, vitaminas y minerales; otra opción sería complementar la leche materna, si así se considera oportuno, con fórmulas elaboradas para prematuros o con fortificantes específicos. La fortificación de la leche materna aunque es fácil durante la hospitalización del recién nacido, no lo es tanto al alta, sobre todo si toma lactancia materna exclusiva (Lucas y Frewtall, 1996). Por ello se recomienda vigilar a estos niños

de una manera estrecha tanto su crecimiento como posibles signos de clínicos o analíticos de raquitismo hipofosfémico.

Si a pesar de todo el crecimiento del recién nacido es lento debe pensarse en posible déficit de proteínas o zinc.

No se ha documentado que haya diferencias en la composición de la leche en niños a término con retraso de crecimiento intrauterino. El fenómeno de recuperación o “catch-up” de estos niños se ha visto que es más rápido si se alimentan con leche materna que con fórmula. Aunque si dicho retraso está en relación con desnutrición materna, el volumen de leche producida por esas madres puede ser menor (Raupp et al., 2000).

2. RELACIÓN ENTRE LECHE MATERNA Y DIETA

La leche materna se trata de una secreción exocrina de compleja composición. Una pequeña parte de sus nutrientes dependerían directamente de la dieta lo que plantea la posibilidad de modificar su contenido.

En general, los micronutrientes y los ácidos grasos pueden estar más asociados con la dieta materna mientras que los macronutrientes parecen menos afectados por las variaciones nutricionales a corto plazo.

La alimentación de la madre así como su estado nutricional son fundamentales debido a la influencia que ejercen sobre la calidad y cantidad de la leche que segregan. De hecho no solo influye el estado nutricional de la madre durante la lactancia sino también durante la gestación e incluso en la etapa preconcepcional (Michaelsen et al., 1994). Hay estudios que muestran la relación entre la ingesta energética total y la producción de leche, disminuyendo si la ingesta energética total materna baja de una forma mantenida en el tiempo por debajo de 1800 calorías/día. En madres desnutridas, la modificación más importante que tiene lugar es la reducción del volumen producido y aunque disminuyen la concentración de macronutrientes en su leche, ésta no es significativa. Asimismo suelen tener hijos con bajo peso al nacimiento. De tal forma que

a peor estado nutricional materno y menos peso al nacer, menor suele ser la duración de la lactancia y ambos eventos se relacionan directamente. El volumen de líquido ingerido por la madre durante la lactancia, no parece afectar a la producción de leche, siempre y cuando la madre tenga un adecuado estado de hidratación. Pero situaciones como el uso de diuréticos, fiebre o restricción hídrica en la madre sí que podrían disminuir de forma significativa el volumen de leche producido. El hábito tabáquico por se parece disminuir el volumen de leche por disminución de la prolactina (Vio et al., 1991).

Es fundamental analizar dicha influencia según los diferentes principios inmediatos por separado, como se describen a continuación.

2.1 RELACIÓN ENTRE LA DIETA Y LA COMPOSICIÓN DE LÍPIDOS DE LA LECHE MATERNA

Los lípidos presentes en la leche humana proceden, por un lado, de los depósitos maternos de grasa y, por otro lado, de la síntesis mamaria y hepática. Pero se desconocen los mecanismos encargados de regular su secreción.

Dentro de los componentes de la leche materna, los lípidos suponen un 3-5%. Aportan un 45-55% de la energía de la leche. Por ello constituyen la principal fuente de energía para el lactante. Además, proporcionan nutrientes esenciales como vitaminas liposolubles y ácidos grasos poliinsaturados (AGPI). Y dentro de estos últimos cabe destacar el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico (DHA) cuya presencia en la leche materna es esencial para un óptimo desarrollo del lactante tanto a nivel neurológico como visual (Martínez, 1992).

Dentro de los nutrientes de la leche materna, los lípidos son los de mayor rango de variabilidad tanto cuantitativa como cualitativamente. Las modificaciones cuantitativas no dependen de la dieta sino de las características de la propia glándula, del ciclo circadiano, del momento del amamantamiento, del día postparto y también varía de una madre a otra. Es de destacar que la cantidad en la leche materna de ácido araquidónico y linoleico en las madres desnutridas proviene casi en su totalidad de las reservas maternas (Del Prado et al., 2001).

Dentro de éstos, los triglicéridos constituyen más del 98%, formados a su vez por unas 200 variedades de ácidos grasos, algunos de ellos con propiedades biológicas específicas como la capacidad bactericida (Uauy et al., 2001). Destacan el ácido araquidónico por ser el principal ácido graso poliinsaturado de la variedad $\omega 6$ y el DHA el principal $\omega 3$. En la leche materna, la relación entre $\omega 6$ y $\omega 3$ es de 10 a 1.

Los niños alimentados con leche materna se ha demostrado que tienen mayor desarrollo psicomotor que los alimentados con leche de fórmula y ello se ha relacionado con el contenido de DHA en la leche materna. De tal forma que si la madre toma concentraciones elevadas de DHA en su dieta, el lactante recibirá mayor cantidad de DHA aunque no afectará al resto de ácidos grasos poliinsaturados (Gibson et al., 1997).

Varios estudios han demostrado, por ejemplo, que la suplementación de la dieta materna con DHA produce un incremento significativo de éste en la leche materna, ocurriendo lo mismo con los niveles de ácido palmítico y oleico sin afectar los de ácido araquidónico y tocoferol (Fidler et al., 2000). Dicha suplementación durante el embarazo y la lactancia sería especialmente útil en recién nacidos prematuros dado que se conoce que es durante el tercer trimestre de gestación cuando se produce el mayor paso de AGPI desde la madre al feto. Por ello los recién nacidos prematuros tienen escasas reservas (Moya et al., 2000).

Se ha visto que cuanto menor concentración de grasa contenga la leche, más prolonga el lactante la duración de cada toma y además las demanda con mayor frecuencia. Como consecuencia dará lugar a un aumento de producción de prolactina lo que aumentará a su vez la cantidad de leche producida y en menor medida la cantidad lipídica que contiene por el efecto de la prolactina sobre la lipasa de la glándula mamaria.

Hay varios estudios controlados que muestran diferencias entre la ganancia ponderal de los lactantes según el contenido graso de la leche materna, no así de la talla ni del perímetro craneal (Michaelsen et al., 1994).

La dieta materna rica en hidratos de carbono y baja en grasas origina un incremento de triglicéridos en la leche materna en comparación con la dieta rica en

grasas y pobre en hidratos de carbono. De hecho, si es una dieta rica en fosfolípidos, colesterol o ácidos grasos de cadena larga, las grasas predominarán en la leche.

Recientes estudios con isotopos estables demuestran que, a pesar de que existe una clara relación entre la ingesta y la excreción en la leche materna de AGPI de cadena larga, lo cual es más significativo en la leche madura, la mayoría de éstos no provendrían de la dieta materna sino de sus reservas endógenas (Sauerwald et al., 2000).

Aquellas madres que llevan a cabo dietas restrictivas (vegetarianismo, veganismo, etc.) por diferentes motivos ven alterada de manera importante la composición de la leche que secretan (Sanders, 1999). Pero a pesar de presentar bajas concentraciones de DHA en hijos de madres vegetarianas, no hay evidencias que tengan limitada la capacidad de sintetizar AGPI de cadena larga. Y es que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la leche materna, además de la dieta, pueden proceder de los depósitos grasos maternos o de su síntesis endógena a partir de los ácidos grasos esenciales (O'Connor et al., 2001).

Los ácidos grasos de cadena larga de la dieta, tras ser absorbidos pasan a la circulación en forma de quilomicrones y son rápidamente transferidos a leche humana. Y en periodos de ayuno se transportan en forma de VLDL desde el hígado y son liberados al torrente sanguíneo gracias a la acción de la lipoproteín-lipasa. Esta enzima captura las lipoproteínas ricas en triglicéridos (quilomicrones y VLDL) e hidroliza los triglicéridos. Durante la lactancia disminuye en el tejido adiposo y aumenta de forma considerable en el tejido mamario por acción de la prolactina (Flint y Knight, 1997). Otras hormonas como la insulina y la hormona de crecimiento también tienen un papel regulador de la enzima.

Durante la vida fetal se produce la acumulación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en el cerebro y retina fetal, a expensas de la madre. Este proceso tiene lugar fundamentalmente en el tercer trimestre de gestación lo que determina que el prematuro es especialmente vulnerable al insuficiente aporte postnatal (Uauy et al., 2001). Las madres múltiparas con lactancia relativamente larga y los embarazos múltiples también constituyen un grupo de riesgo susceptible de suplementar ya que pueden tener las reservas disminuidas.

Durante la gestación es el momento en que se acumula tejido adiposo que posteriormente será movilizado durante la lactancia. Es por ello que si se pretende modificar en mayor medida la composición de ácidos grasos habrá que realizar una intervención dietética ya durante el embarazo. Hay por ejemplo estudios de suplemento de DHA en madres durante la lactancia y muestran un aumento del contenido de DHA en la leche, proporcional al aumento de DHA en plasma materno mientras que no muestran modificaciones en el contenido de ácido araquidónico en la leche materna. (Koletzko et al., 2001).

El balance entre los $\omega 3$ y $\omega 6$ en la leche materna puede verse modificado ante determinados cuadros clínicos. Por ejemplo, se ha propuesto en familias muy atópicas un aumento de la ingesta de gama linoléico ($\omega 6$) y en madres de prematuros se ha documentado el aumento del aporte de carbohidratos para favorecer la producción de ácidos grasos de cadena media en la leche.

Las dietas ricas en ácidos grasos trans elevan los niveles de ácido linoleico en la leche materna sin afectar a los AGPI de cadena larga. Múltiples estudios demuestran que el consumo de margarina favorecería el depósito de ácidos grasos trans en el tejido adiposo materno y de ahí podría ser movilizado durante la lactancia pasando así a la leche materna con las consecuencias que ello supondría para el lactante. En cambio, el consumo de aceite de oliva incrementaría los ácidos grasos insaturados de cadena media en la leche humana (Larque et al., 2001).

Finalmente, en relación al contenido del colesterol en la leche madura no varía con la dieta materna. Así, los niveles de colesterol total en niños lactantes no se correlacionan con la cantidad de colesterol y grasa ingerida por la madre. En cambio, sí que se ha demostrado en la etapa adulta que tienen menores niveles de colesterol total y LDL aquellos que recibieron lactancia materna frente a los alimentados con fórmula. (Owen et al., 2002)

2.2 RELACIÓN ENTRE LA DIETA Y LA COMPOSICIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO DE LA LECHE MATERNA

Una dieta rica en hidratos de carbono da lugar a una mayor incorporación de ácidos grasos (tipo C6:0-C14:0) en los triglicéridos de la leche así como en cada una de las subclases de fosfolípidos. Por tanto hay una relación directa entre el contenido de ácidos grasos de cadena media en la leche humana y la cantidad de hidratos de carbono ingeridos por la madre (Van Beusekom et al., 1990). A su vez, durante la lactancia existe un incremento de la demanda de glucosa y ello se soluciona con el aumento de la glucogenolisis (Tigas et al., 2002).

2.3 RELACIÓN ENTRE LA DIETA Y LA COMPOSICIÓN DE MICRONUTRIENTES DE LA LECHE MATERNA

2.3.1 VITAMINAS

Los niveles de vitaminas presentes en la leche materna deberían ser óptimos porque deben de suplir los requerimientos del lactante. Sus valores dependen tanto de la dieta materna como de su estado nutricional. Hay por tanto una gran variabilidad en la leche humana por los diferentes hábitos alimentarios.

Hay ciertas vitaminas, como por ejemplo la **vitamina E** o **α -tocoferol** cuya concentración en la leche va disminuyendo a medida que ésta va madurando siendo discretamente superior en la leche de transición respecto a la leche madura (Picciano, 1995). La vitamina E tiene una potente actividad antioxidante. Es capaz de inhibir la peroxidación lipídica, disminuir el riesgo de hemólisis así como de otras patologías del recién nacido, sobre todo en prematuros.

Las madres vegetarianas suelen tener niveles séricos más bajos de **vitamina B12** si no reciben los suplementos oportunos por lo que los lactantes alimentados con dicha leche podrían a su vez tener déficit de dicha vitamina.

Los niveles de **vitamina D** en la leche materna dependen directamente de la exposición solar materna. Son fundamentales unos niveles adecuados dado que su déficit puede conllevar al raquitismo (Laskey et al., 1998).

Una dieta rica en **vitamina C** se ve reflejada en sus niveles tanto en plasma como en leche maternos, de ahí la importancia de un consumo adecuado y diario de frutas y verduras en las mujeres gestantes.

En mujeres fumadoras es curioso como no hay diferencias en sus niveles plasmáticos respecto a las no fumadoras pero sí que lo hay en la leche materna, siendo en esta menor en la leche de las madres fumadoras (Ortega et al., 1998).

La cantidad de **vitamina K** en la leche humana depende fundamentalmente de la ingesta dietética materna. Hay una correlación entre el colesterol y la vitamina K pues se cree que el colesterol interviene en la secreción de dicha vitamina pero lo cierto es que no se ha podido demostrar dicha relación con los lípidos totales (Von Kries et al., 1987).

La protección propiciada por la leche materna se debe, en gran parte, a la concentración de antioxidantes que posea por su papel protector frente a la peroxidación. Estos pueden depender de la dieta o de los hábitos maternos. De hecho, al igual que ocurre con la vitamina C, las mujeres fumadoras tienen menos concentración de vitamina E y lípidos en la leche madura que en las no fumadoras (Cho y Choi, 1994).

2.3.2 MINERALES Y OTROS MICRONUTRIENTES

Los niveles de **calcio** en la leche humana se modifican según el estadio madurativo de ésta, siendo menor en la leche madura respecto a la de transición. Esto podría ser modificado si la mujer recibiera un suplemento de calcio durante la gestación. Por otro lado, si hubiera déficit en la ingesta de calcio en la madre se compensaría mediante un aumento del recambio mineral ósea materno (Prentice, 1998).

Las madres precisan de suplementación diaria de **folatos** para poder satisfacer las necesidades del lactante. La cantidad de éstos en la leche materna se mantendrá constante pero lo hará a costa de la disminución en el estado nutricional materno (Ortega et al., 1998).

La cantidad de **zinc** en la leche materna se mantiene relativamente constante incluso si hubiese escasa ingesta de éste. Los niveles de zinc en la leche materna se relacionan de forma proporcional con su ingesta materna. Por tanto, si las madres consumen zinc de forma adecuada en la dieta no precisarán suplemento nutricional adicional (Wauben et al., 1999).

Por el contrario, los niveles de **hierro** y **cobre** en la leche materna no dependen de la dieta materna.

El contenido de **yodo** en la leche materna está influenciado directamente por la ingesta materna del mismo. Es fundamental que su aporte sea el adecuado para asegurar así un óptimo desarrollo físico y mental del lactante (Semba y Delange, 2001).

Los niveles de **selenio** en la leche materna van disminuyendo a medida que avanza la maduración de la leche, desde calostro a leche madura. Además, dichos niveles no se correlacionan ni con la ingesta materna del mismo ni tampoco con el estado nutricional materno. Parece que hay una correlación inversa entre los niveles de zinc y de selenio en la leche materna (Bianchi et al., 1990).

3. FUNCIÓN ANTIOXIDANTE DE LOS ALIMENTOS. METABOLISMO OXIDATIVO

3.1 INTRODUCCIÓN: METABOLISMO OXIDATIVO

Se denomina “antioxidante” a aquel compuesto capaz de aceptar o donar un electrón a los radicales libres mientras conserva su estabilidad, por lo que no se transforma en una molécula reactiva al perder dicho electrón. Ello les proporciona capacidad de frenar la cadena de oxidación. Halliwell sin embargo, simplifica esta definición como “cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo sufrido por una molécula diana” (Halliwell, 2012).

El estrés oxidativo tiene lugar debido a un desequilibrio entre los sistemas oxidativos y los mecanismos antioxidantes, en detrimento de éstos últimos. Ello dará lugar a la generación de grandes cantidades de radicales libres o una disminución en la velocidad de su neutralización. Todo ello desembocará en la oxidación de biomoléculas

con la pérdida de sus funciones biológicas que ello supone así como una disregulación en la homeostasis dando lugar a un posible daño oxidativo tanto a nivel celular como tisular (Hicks et al., 2006).

La cronificación de dicha situación de estrés oxidativo se ha visto relacionada con el desarrollo de diversas enfermedades crónicas no transmisibles como la obesidad, la diabetes, el cáncer y trastornos neurodegenerativos (Galili et al., 2007).

Se han desarrollado diferentes mecanismos de defensa antioxidante con el objetivo de proteger contra los daños oxidativos. Se basan en impedir la formación de especies reactivas y/o radicales libres, inhibir su acción o favorecer la reparación de las estructuras dañadas (Vincent et al., 2007).

3.2 CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES

Los antioxidantes tienen diversas clasificaciones según el criterio que se tenga en cuenta:

- a) Medio de actuación: fase lipídica o acuosa.
- b) Composición: vitaminas, minerales u oligoelementos.
- c) Modo de acción: primaria, secundaria o terciaria.
- d) Función: secuestrante, reparadora o enzimática
- e) Origen: endógenos o exógenos.

A continuación se describen los diferentes medios de actuación, el modo de acción y el origen de los antioxidantes

Los antioxidantes de **fase lipídica** actúan fundamentalmente sobre la membrana. Dentro de ellos, destacan la Vitamina E (tocoferoles) cuya misión es estabilizar las membranas, prevenir la peroxidación lipídica y barrer radicales peroxilo; la Vitamina A (carotenoides) que se encargará de prevenir la peroxidación lipídica, barrer radicales peroxilo y oxígeno singlete; y el Ubiquinol-10 (coenzima Q reducida) que previene la oxidación del ADN y de los lípidos de membrana. Por otra parte, los de **fase acuosa** actuarán en el medio extracelular y en el plasma. Entre ellos cabe reseñar la Vitamina C

o ácido ascórbico, que barre el ión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) el radical hidroxilo (OH^-), radicales peroxilo, oxígeno singlete y ácido hipocloroso (producto de la actividad fagocítica) y actúa como cofactor de enzimas con actividad hidroxilasa; ácido úrico que forma complejos estables con el hierro y protege frente al ozono; y las proteínas, cuyos grupos sulfhidrilo donarán un electrón para neutralizar radicales libres, la albúmina unirá iones cobre y neutralizará el ácido hipocloroso, y la haptoglobina unirá la hemoglobina plasmática libre previniendo su auto-oxidación.

Teniendo en cuenta su composición, se realiza otra categorización diferente, aunque se solapa en cierta forma con el resto de clasificaciones puesto que el sistema no enzimático está integrado principalmente por sustancias como las vitaminas A, C, E y minerales tales como el selenio o el zinc, entre otros. Se propugna su uso en la prevención de enfermedades cardiovasculares crónicas.

Otra posible clasificación se hace con respecto a su modo de acción y tipos de prevención. Así, los antioxidantes de acción **primaria** previenen la formación de radicales detoxificándolos (catalasa, glutatión peroxidasa o superóxido dismutasa); los de acción **secundaria** entran en acción ante una concentración excesiva de radicales libres y previenen la propagación en cadena (glutatión, tocoferoles, ácido ascórbico o carotenoides); y los de acción **terciaria**, son los que reparan el daño molecular o retiran los productos dañados y los sistemas reparadores de ADN y ARN (Jena, 2012).

Otra de las clasificaciones es en función de su modo de acción. Hay algunos que se encargan de interactuar directamente con especies reactivas. Hay otros que previenen la formación enzimática de especies reactivas. Y otro subgrupo es el encargado de la inducción o activación de la actividad de enzimas antioxidantes.

En cuanto a su origen, por un lado están los antioxidantes **endógenos**, presentes en los organismos, que catalizan la transformación de los radicales libres en compuestos menos reactivos. Entre ellos se encuentran enzimas como:

- Superóxido dismutasa (SOD): que produce dismutación del O_2 a H_2O_2 .
- Catalasa: presente en todos los tejidos, disgrega el H_2O_2 en $H_2O + O_2$.
- Glutatión peroxidasa (GPx): presente en plasma, citoplasma y mitocondrias, su misión es reducir los hidroperóxidos.

- Glutación reductasa (Gr): reduce el glutati3n oxidado a glutati3n en la cadena respiratoria.
- Tiorredoxinas (TOx): que se encargan de la reducci3n de uniones disulfuro.

Tambi3n son end3genos otros compuestos no enzim3ticos como el glutati3n, la N-acetilciste3na, la tioprolina, la taurina, el 3cido 3rico o las prote3nas fijadoras de metales.

En general, las enzimas antioxidantes tienen distintas y variadas funciones, desde el secuestro y desactivaci3n de los radicales libres hasta la regeneraci3n de otros antioxidantes. Catalizan diversas reacciones por las que desactivan radicales libres, recuperan mol3culas oxidadas, colaboran en la desactivaci3n de xenobi3ticos, y reparan da3os y regeneran otras mol3culas antioxidantes (L'Abbe y Friel, 2000).

La SOD dependiente de magnesio cataliza la transformaci3n del O₂ en per3xido de hidr3geno que luego ser3 desactivado por otras enzimas como la catalasa o la glutati3n peroxidasa. As3 disminuye la carga de O₂ generado en la cadena respiratoria de las mitocondrias y se evita la inutilizaci3n de las deshidratasas (Zelko et al., 2002).

La catalasa cataliza la desactivaci3n del H₂O₂ en agua y O₂. Se localiza fundamentalmente en los peroxisomas.

La GPx cataliza la oxidaci3n del glutati3n reducido y con ello participa en la recuperaci3n de mol3culas oxidadas como la α -tocoferol oxidada, l3pidos o ADN. Es esencial para conservar la integridad y funci3n de las membranas, siendo capaz de detoxificar los per3xidos lip3dicos y el H₂O₂ hasta agua en el interior del citoplasma y de la mitocondria (Masella et al., 2005).

Las tiorredoxinas tienen un papel antioxidante esencial en el citoplasma y la mitocondria, disminuyen la carga de especies reactivas de ox3geno al reducir los disulfitos en los grupos tiol y mantiene otras prote3nas en su estado reducido. Tras ser oxidadas son regeneradas por la tiorredoxina reductasa que usa el NADPH como donante de electrones. Adem3s forman parte de los redoxisomas que regulan la se3nalizaci3n celular lo que las relaciona con la g3nesis de diversas enfermedades como el c3ncer, enfermedades autoinmunes y diabetes (Yoshihara et al., 2014).

Dentro de los compuestos no enzimáticos, destaca el Glutati3n. Se trata de una mol3cula sintetizada en el h3gado y compuesta por 3 p3ptidos: 3cido glut3mico, ciste3na y glicina. Se considera la mol3cula antioxidante de origen end3geno m3s importante. El grupo tiol reducido de la ciste3na (-SH) le confiere una gran capacidad como antioxidante; el glutati3n oxidado resulta de la uni3n de 2 mol3culas de glutati3n por medio de un puente disulfuro. La disponibilidad de ciste3na limita la producci3n de glutati3n. El glutati3n participa en la s3ntesis de ADN, en la detoxificaci3n de xenobi3ticos y act3a como antioxidante estabilizando radicales como hidroxilo, super3xido y per3xidos, directamente o a trav3s de la GPx siendo para algunos autores, el equilibrio entre ambos, el principal determinante del estado oxidativo del organismo humano (Wally et al., 2012).

La Coenzima Q10 o ubiquinona es un compuesto lip3dico esencial que forma parte de la cadena respiratoria de las mitocondrias. Se trata de un potente antioxidante que juega un papel fundamental en la prevenci3n del da3o oxidativo del ADN, de las lipoprote3nas y de los l3pidos de la membrana celular. Es sintetizada como producto terminal en la v3a del mevalonato aunque tambi3n es obtenida por el organismo a trav3s de la dieta. Es considerada como el antioxidante lipof3lico m3s importante, de s3ntesis end3gena (Bentinger et al., 2007).

La lactoferrina es una prote3na constituida por una 3nica cadena y en su estado natural est3 parcialmente saturada. En su forma saturada es muy resistente a la prote3lisis. Su acci3n antioxidante radica en su capacidad para atrapar hierro libre que es un potente oxidante y hacia el que posee una elevada afinidad por disponer de 2 receptores en cada mol3cula. En el interior del n3cleo es capaz de bloquear el factor de transcripci3n inhibiendo la producci3n y suelta de citoquinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 y TNF- α) y de algunos mediadores inflamatorios como el 3xido nitroso y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macr3fagos o de prostaglandinas (PGE1 y PGE2), limitando as3 la producci3n de radicales libres como el i3n super3xido (L3nnerdal, 2010).

Por otro lado, se encuentran los antioxidantes **ex3genos**, que son aquellos que necesitan ser aportados a trav3s de la dieta dado que no pueden ser sintetizados por el

organismo, como por ejemplo las vitaminas A, C y E, el ácido fólico y los polifenoles (Lobo et al., 2010).

3.3 ANTIOXIDANTES DIETÉTICOS Y SUS ACCIONES

A través de los alimentos de la dieta se obtienen los nutrientes necesarios para cubrir sus funciones biológicas, fundamental durante el crecimiento en el infancia. Además se obtienen sustancias que influyen sobre el mantenimiento del estado de salud de los individuos. Es muy importante que se obtenga un equilibrio entre los compuestos oxidantes y reductores, lo que se conoce como *equilibrio REDOX*.

Los alimentos son una fuente importante de antioxidantes como vitaminas, polifenoles y flavonoides. Pero a su vez la dieta también puede ocasionar agresiones oxidativas como por ejemplo el aporte excesivo de calorías lo que puede generar desequilibrio oxidativo lo cual a su vez genera un aumento de las necesidades de antioxidantes. Los alimentos de origen vegetal tales como verduras y frutas así como sus derivados (vino y cerveza) son especialmente ricos en antioxidantes como la vitamina C, polifenoles o coenzima Q.

Se pueden clasificar a los antioxidantes en dos grandes grupos: enzimáticos y no enzimáticos. Los antioxidantes de origen dietético (entre los que destacan los minerales, las vitaminas y los polifenoles) estarían incluidos dentro del segundo grupo. Dentro de las vitaminas, destacan por su gran potencial antioxidante las vitaminas A y C (ácido ascórbico) (Rodrigo et al., 2007). El licopeno es un carotenoide con elevado poder antioxidante. Y entre los minerales destacan el cobre, zinc, manganeso y selenio ya que actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes y serían capaces de neutralizar mecanismos oxidativos. Dentro de los enzimáticos destacan la superóxido dismutasa (SOD), catalasa y GPx.

A continuación se enumeran las principales funciones de los antioxidantes más destacados:

- **Vitamina C:** es un potente antioxidante hidrosoluble presente en concentraciones elevadas en plasma y medios tisulares (tanto en el citosol como

en el medio extracelular). Es necesaria para regenerar el α -tocoferol y es capaz de reaccionar con numerosos radicales libres. Al oxidarse se transforma en dehidroascorbato que es regenerado de nuevo a ácido ascórbico en presencia de glutatión o por la acción de la dehidroascorbato reductasa. En presencia de metales de transición oxidados como el hierro o el cobre, la vitamina C puede actuar como pro-oxidante. Así pues, inhibe las especies reactivas de oxígeno, protege frente a los daños causados por la lipoproteína de baja densidad oxidada y estimula el poder antioxidante de la vitamina E y el selenio (Silencio y Santiago, 2013).

Esta vitamina es sintetizada por plantas y por muchos animales, pero no por humanos ni mamíferos. Está presente en frutas como los cítricos, el kiwi, las fresas y el melón, y en verduras como el tomate, el pimiento, repollo y brócoli. De los productos de origen animal, el hígado la contiene en pequeñas cantidades, y en menor medida en otros órganos con también elevada actividad metabólica como glándulas suprarrenales, páncreas, cerebro, ojos o hipófisis. Sus depósitos corporales son escasos y poco duraderos; se elimina por la orina en pequeñas cantidades. Por ello se necesita un aporte casi diario a través de los alimentos. Es destruida fácilmente con la cocción y se oxida con facilidad en la exposición al aire ambiente. Por esto el mejor aporte lo ofrecen las frutas frescas aunque el pelado, el cortado y el licuado provocan pérdidas no despreciables. También interfiere en su absorción la fibra y los fitatos, la cual tiene lugar en duodeno y yeyuno (Huang et al., 2002).

- **Vitamina E:** compuesta por un grupo de moléculas liposolubles entre las que hay tocoferoles y tocotrienoles que se encuentran asociadas a los lípidos en membranas y plasma. Están considerados como el antioxidante natural más potente. Son de suma importancia en la protección de la integridad de las membranas debido a su actividad de control de las reacciones de lipoperoxidación. Al unirse con los radicales libres, se oxida dando lugar a tocoferoxilos que son reducidos de nuevo a tocoferol por la acción del ácido ascórbico o el ubiquinol (Abudu et al., 2004). En ausencia de estas moléculas, un

exceso de vitamina E oxidada puede actuar como pro-oxidante y favorecer la peroxidación de las LDL. De ahí la importancia de la presencia de cantidades adecuadas de vitamina C (en medio acuoso) y de coenzima Q (en medio lipídico). En resumen, la vitamina E protege contra la peroxidación de los ácidos grasos insaturados de la membrana celular y transforma el O₂ y H₂O₂ en formas menos reactivas (Abudu et al., 2004).

Se encuentra presente en multitud de aceites como el de girasol, maíz, soja y colza y en frutos secos como nueces y avellanas. También son ricos en vitamina E las legumbres, la leche y cereales integrales.

- **Vitamina A**, carotenoides: protegen frente a la oxidación de lípidos y ADN. La vitamina A se obtiene a través de la dieta en forma lipófila (retinol) e hidrófila (carotenoides). Estos últimos son los pigmentos responsables del color amarillo, anaranjado o rojo de frutas y verduras. Son fuente rica de ella: tomate, calabaza, mango, zanahoria o espinacas, que son ricos especialmente en β y α -carotenos, en licopenos y en luteína. El derivado lipofílico, sin embargo, lo contienen alimentos como el hígado de animales, las carnes, la yema de huevo, la leche y sus derivados con contenido graso. La ingesta de grasa favorece la absorción de los carotenoides de los alimentos, pero su biodisponibilidad viene condicionada también por el procesado y su estructura.

Los carotenoides son moléculas de hidrocarburo poliénico que pueden contener hasta 15 dobles enlaces en su molécula y se subdividen en carotenos (α - y β -carotenos y licopenos) que no contienen O₂ en su molécula y xantofilas que son carotenoides oxigenados con grupos carboxilos e hidroxilos (Lobo et al., 2012).

Los carotenos son los precursores de vitamina A o retinol y el más activo y cuantitativamente más importante es el β -caroteno. La importancia de su acción antioxidante se debe a su riqueza en dobles enlaces lo que les permite gran capacidad de control de radicales libres. El número de dobles enlaces influye en su capacidad antioxidante y son mucho más eficaces los carotenoides con 8 o más dobles enlaces en su molécula. Estos antioxidantes son especialmente importantes en la prevención de la peroxidación lipídica y modulan los niveles

de otros antioxidantes contribuyendo a su regeneración (Azeredo y Trugo, 2008).

Los carotenoides son absorbidos en su mayoría en el intestino delgado por difusión pasiva, incorporados a los quilomicrones y transportados por la linfa hasta el hígado donde serán almacenados hasta que sean 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. El exceso de carotenoides en la dieta provoca que en lugar de su absorción se eliminen a la luz intestinal. Y su excreción se produce mayoritariamente a través de la bilis (Fito et al., 2007).

- **Polifenoles:** son derivados benzo-gamma-piranos y según su grado de oxidación se subdividen a su vez en varias clases, entre las que destacan los flavonoides porque son los de mayor capacidad antioxidante. Su estructura química, con varios anillos unidos por dobles enlaces les permite con facilidad captar radicales libres, desactivarlos o impedir su formación. Además son capaces de quelar el hierro y el cobre, favorecer la acción de enzimas antioxidantes e inhibir enzimas pro-oxidantes (Halliwell, 2012).

La ingesta de té, chocolate y otros alimentos ricos en polifenoles se ha relacionado con una disminución de las enfermedades cardiovasculares (Vita et al., 2005) y cáncer de colon (Martínez-Flores et al., 2002). En el colon podrían actuar como secuestradores de diversos radicales libres (Román, 2007; Valls-Bellés et al., 2005).

- **Melanoidinas:** son polímeros formados al reaccionar carbohidratos y moléculas que contienen un grupo amino libre (aminoácidos, péptidos y proteínas) por la reacción de Maillard. Tienen elevada capacidad antioxidante, inhiben la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. Son las sustancias que dan color marrón a alimentos como el café, la malta o la cerveza (Rivero et al., 2005).

- **Cobre, Zinc, Manganeso, Selenio y otros:** actúan como cofactores de las enzimas antioxidantes. Y es que a través de los alimentos, el organismo también se surte de minerales como el hierro, el zinc, el magnesio, el selenio y otros, cuya presencia es fundamental para la acción de numerosos antioxidantes endógenos.

El Zinc es esencial para el crecimiento, la inmunidad celular y participa como cofactor de numerosas enzimas en los procesos de oxi-reducción.

El selenio está integrado en la molécula de la GPx donde deriva la importancia de su función como antioxidante.

El manganeso es un componente necesario para algunas enzimas como la SOD (Waly, 2012).

En resumen, cada vez hay más evidencia de los efectos beneficiosos de una dieta variada y rica en estos alimentos para la prevención de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo y el envejecimiento celular en relación con su capacidad antioxidante

Para poder decir que un antioxidante tiene “función biológica” es necesario que estando en cantidades muy pequeñas en comparación con el sustrato oxidable, sea capaz de evitar su oxidación o, al menos, disminuirla. Ello lo pueden llevar a cabo de una forma directa (neutralizando los radicales libres) o indirecta (mediante sistemas enzimáticos) (Halliwell y Whiteman, 2004).

Cabe destacar que el aporte de antioxidantes debe ser equilibrado, como el que ofertan los alimentos, ya que el aporte aislado de un solo tipo de antioxidantes, por ejemplo, el aportado al tomar suplementos puede conducir a situaciones de pro-oxidación que provoquen efectos contrarios a los deseados (Herrera et al., 2009).

La oxidación de biomoléculas tendrá lugar cuando la producción de radicales libres se vea superada por la capacidad de acción de los antioxidantes. Se producirán así una serie de marcadores de estrés oxidativo que están basados en el análisis de la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. También hay una forma indirecta de su evaluación, basada en la capacidad antioxidante propiamente dicha.

La evidencia científica avala que el estrés oxidativo estaría estrechamente implicado en el síndrome metabólico.

Además de todo lo que conlleva el estrés oxidativo, la dieta es *per se* un factor modulador de suma importancia. De ahí la gran relevancia de los marcadores de estrés oxidativo así como la evaluación de los posibles efectos adversos y la influencia de la dieta sobre dichos mecanismos (Furukawa et al., 2004).

3.4 DIETA MEDITERRÁNEA Y ESTRÉS OXIDATIVO

Hay múltiples estudios en los que en lugar de analizar únicamente por separado la acción de ciertos alimentos sobre el estrés oxidativo, lo hacen analizando en conjunto el patrón dietético en cuestión. En éstos se tiene en cuenta la posible interacción de los diferentes nutrientes entre sí y no de forma aislada. Aunque presentan una gran heterogeneidad metodológica lo que dificulta la comparación entre ellos.

Sin duda, destaca el estudio PREDIMED (PREvención con Dieta MEDiterránea). Se trata de un estudio multicéntrico, aleatorizado, prospectivo y controlado. Su objetivo fue valorar tanto la eficacia como seguridad de llevar a cabo un cambio en la dieta, sustituyendo la previa por dieta mediterránea como prevención primaria de enfermedad cardiovascular.

Los individuos incluidos presentaban riesgo cardiovascular elevado y seguirían una dieta mediterránea suplementada con frutos secos (15 g almendras y 15 g nueces) o con aceite de oliva virgen (1 l a la semana). A los 3 meses, en comparación con una dieta baja en grasa, se apreció descenso de las cifras de tensión arterial así como del cociente colesterol total/HDL y de los niveles de proteína C reactiva. Todos ellos considerados como marcadores de riesgo cardiovascular.

En relación con los marcadores de estrés oxidativo, también se habían mejorado los niveles plasmáticos de LDL ox (lipoproteínas de baja densidad oxidadas) y de MDA (malondialdehído) en dichos pacientes (Fito et al., 2007).

Asimismo, dentro de los alimentos incluidos en la dieta mediterránea, se pudo relacionar el consumo de frutas, cereales y aceite de oliva virgen con menores

concentraciones de marcadores relacionados con la disfunción endotelial en pacientes del estudio (Salas-Salvado et al., 2008).

La dieta mediterránea destaca por el importante consumo de frutas, legumbres, cereales integrales, frutos secos y pescado. El aceite de oliva es pieza fundamental por ser la principal fuente de grasa, aportando ácidos grasos monoinsaturados y polifenoles. El vino tinto, que aparece con frecuencia, es fuente rica de polifenoles.

A este respecto destaca un estudio randomizado a simple ciego denominado *Lyon Diet Heart Study*. Demuestra la eficacia en la prevención secundaria de las enfermedades cardiovasculares por la disminución de hasta un 70% del riesgo de recurrencia tras 4 años de una dieta mediterránea rica en ácido linolénico (De Lorgeril et al., 1999).

El efecto beneficioso que ejerce sobre los marcadores de estrés oxidativo la dieta mediterránea se ha asociado al sinergismo entre micro y macronutrientes de los alimentos que componen este tipo de dieta. Destaca el efecto producido sobre los niveles plasmáticos de TBARs (Thiobarbituric Reactive Acid Substances) y sobre el efecto en la GPx (Vidurrizaga et al., 2008).

3.5 OTROS PATRONES DIETÉTICOS

Se cree que hay otros patrones dietéticos, además de la dieta mediterránea, que serían capaces de influir sobre los marcadores de estrés oxidativos. Entre ellos se encuentran el tipo y cantidad de hidratos de carbono y grasa, frutas y legumbres y contenido de antioxidantes propiamente dicho.

Una dieta baja en grasa y con alto contenido en fibra puede ser capaz de disminuir los niveles de 8-epiPGF₂ (prostaglandin F_{2α} 8 isoprostano). Su justificación radica en que, por un lado, al tomar gran cantidad de fibra se consume así gran cantidad de nutrientes antioxidantes y, por otro lado, se disminuye el consumo de azúcares refinados y de grasas saturadas (Ambring et al., 2004).

La evidencia científica avala que la restricción calórica está íntimamente relacionada con la regulación del estrés oxidativo. Ello se atribuye a la disminución del peso corporal y las consecuencias que ello supone. Así, en personas obesas hay un

incremento de la expresión de los marcadores de estrés oxidativo, lo que a su vez está directamente correlacionado con el tejido adiposo (Johnson et al., 2007).

Hay múltiples estudios que muestran los efectos positivos de la restricción calórica sobre algunos marcadores de estrés oxidativo, sobre todo los basados en la oxidación de lípidos (TBARS, MDA e isoprostanos), ADN y proteínas (carbonilos y nitrotirosina) así como los efectos sobre la superóxido dismutasa. Pero la limitación de éstos es que en su mayoría se producen en individuos obesos o con sobrepeso. Por ejemplo, tras 6 meses de restricción calórica en pacientes obesos se ha visto una disminución de los marcadores de estrés oxidativo, pero no en pacientes con normopeso. Los efectos beneficiosos se han constatado tanto a corto como a largo plazo (Crujeiras et al., 2007).

Se debe tener en cuenta que hay cierta predisposición genética así como diferentes mecanismos de regulación de la composición corporal que pueden influir a la hora de interpretar los resultados de los estudios.

3.6 VITAMINAS, MINERALES Y ESTRÉS OXIDATIVO

En general, la suplementación de vitaminas y minerales actúa de forma beneficiosa sobre algunos marcadores de estrés oxidativo, sobre todo los que se basan en la oxidación de lípidos, proteínas y ADN. Por el contrario, no tienen influencia sobre la capacidad antioxidante. Concretamente, la suplementación de selenio logra aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes entre las que destaca la GPx (Mishra et al., 2007).

En el caso de la vitamina E, se han observado diferencias según sexo, siendo más efectiva la suplementación en los hombres respecto a la mujeres. Produce efectos favorables sobre los niveles plasmáticos de MDA así como de otros marcadores basados en la oxidación de lípidos (Roberts et al., 2007).

A pesar de todo, actualmente no son concluyentes los efectos sobre el estrés oxidativo de la suplementación de minerales y vitaminas ni tampoco se ha establecido la dosis ni la duración necesaria para dicho beneficio. Por otro lado, hay otros parámetros

que por ellos mismos también pueden afectar al estrés oxidativo como la edad, el índice de masa corporal o el tabaquismo entre otros (Actis-Goretta, 2004).

El efecto antioxidante producido es diferente según proceda de las vitaminas o de los minerales. Las vitaminas actúan aceptando o donando electrones en las reacciones de oxidación y reducción. Los minerales, en cambio, se encargan de regular la actividad de las enzimas antioxidantes. Asimismo se ha investigado el efecto que puede producir la suplementación de varias vitaminas o minerales a la vez, y se han descrito efectos favorables sobre los niveles plasmáticos de MDA, TBARS y LDL-ox. Por el contrario, no se han apreciado efectos de la suplementación conjunta de vitaminas A y C y de zinc y selenio (Dunstan et al., 2007).

Su efecto antioxidante depende de otros factores como su biodisponibilidad y absorción, su concentración plasmática ideal para realizar su actividad antioxidante, el tipo de radicales libres o especies reactivas generados durante el proceso oxidativo así como la variabilidad en la metodología de laboratorio. Todo ello es necesario tenerlo en cuenta para poder valorar e interpretar las diferencias encontradas entre los distintos estudios (Opara, 2002).

3.7 EFECTO DE LOS POLIFENOLES Y CAROTENOIDES SOBRE EL ESTRÉS OXIDATIVO

Los estudios que hay sobre el efecto que tienen los polifenoles y carotenoides sobre el estrés oxidativo están basados en la suplementación dietética con alimentos o bebidas ricas en éstos.

Al igual que ocurre con los estudios de suplementación de vitaminas y minerales, hay gran disparidad en los resultados puesto que hay gran variedad en la duración del periodo de suplementación así como en la diferente cantidad suplementada en función de la fuente de donde procedan, lo que los hace difícilmente comparables entre sí. Otros factores que también influirían en los resultados serían de nuevo la edad, el índice de masa corporal así como el estado de salud de los individuos del estudio (D'Archivio et al., 2007).

Los polifenoles son un grupo de moléculas cuya estructura posee varios grupos fenólicos y tiene una gran actividad antioxidante. Destacan los polifenoles del vino entre los que se encuentran los ácidos fenólicos, quercetina, catequinas y resveratrol. También son de gran importancia los polifenoles presentes en infusiones y extractos naturales, destacando las catequinas presentes en el té verde (Pignatelli, 2006). En relación a los carotenoides, el licopeno destaca por sus acciones antioxidantes. Los tomates y sus derivados son las fuentes más representativas de éstos. En el aceite de oliva, están presentes, sobre todo, los fenoles simples hidrotirosol y tirosol. El efecto antioxidante de los polifenoles depende de su biodisponibilidad y absorción.

Hay varios factores que afectarán al contenido de éstos en alimentos y bebidas: exposición solar, tipo de suelo, tipo de cultivo y clima. La mayoría de polifenoles en las frutas y verduras se encuentran en sus capas más externas, por ello pelarlos, cocinarlos y almacenarlos puede modificar su cantidad. Pueden ejercer su acción antioxidante en el tracto digestivo, incluso antes de su absorción.

Hay ciertos componentes de los alimentos y bebidas que pueden interactuar con los polifenoles. Ejemplo de ello sería la presencia de alcohol que puede aumentar la absorción de los polifenoles del vino al aumentar su solubilidad.

Algunos autores destacan el papel beneficioso de la ingesta de polifenoles junto con una comida rica en grasa. Ello se relaciona con el papel que ejercerían los antioxidantes en la atenuación del estrés oxidativo postprandial. Se vería especialmente en situaciones donde haya asociado elevado riesgo de aterosclerosis diabetes u obesidad. En esos casos, mejoran la disfunción endotelial y disminuyen la susceptibilidad de las LDL a ser oxidadas (Sies et al., 2005).

- **Vino:** Es considerado clásicamente como un potente antioxidante. Su acción sobre los marcadores de estrés oxidativo se debe a los polifenoles que contiene. Estos compuestos están presentes, mayoritariamente, en las semillas de las uvas. De tal forma que su concentración dependerá del tipo de uva utilizada, de las condiciones climáticas en que se formó el fruto así como del modo de procesamiento y fabricación del vino. El vino tinto en comparación al blanco, presenta mayor concentración de tales compuestos (Pignatelli et al., 2006).

- **Aceite de oliva:** Los ácidos grasos monoinsaturados que contiene, comparados a los poliinsaturados, tienen mejores efectos sobre los marcadores de estrés oxidativo. Asimismo aporta también fenoles simples que están presentes en el aceite de oliva virgen pues la mayoría se perderán durante el refinamiento. Ejerce efectos beneficiosos sobre el estrés oxidativo apreciables a través del estudio de sus marcadores, tanto a corto como a largo plazo (Visioli et al., 2005; Salvini et al., 2006).
- **Té verde:** Es la principal fuente de catequinas. Éstas tienen efectos positivos sobre el estrés oxidativo. El té negro y la cebolla contienen otro compuesto polifenólico llamado quercetina (Nagao, 2005).
- **Tomate:** Es rico en licopeno y se ha relacionado con el efecto positivo sobre los niveles plasmáticos de carotenoides (Tyssandier, 2004).

4. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA

4.1 INTRODUCCIÓN

La leche humana presenta una importante capacidad antioxidante; además, contiene sustancias antioxidantes que ningún otro alimento en ninguna otra etapa de la vida es capaz de aportar. Por un lado, es protegida de la oxidación y deterioro de sus componentes. Por otro lado, debido a que suele ser consumida casi al mismo tiempo que es generada, todo este contenido antioxidante tiene a su vez la misión de ayudar a proteger el estado oxidativo del recién nacido. La capacidad antioxidante de la leche humana es el resultado no sólo del contenido en antioxidantes sino también de la actuación sinérgica de los mismos.

Los antioxidantes de la leche humana, una vez ingeridos por el recién nacido, son capaces de actuar a nivel local, protegiendo el tracto respiratorio e intestinal

(mediante la protección de las células epiteliales) y a nivel general (mediante la reducción espontánea del citocromo C) (Ezaki et al., 2008).

En el calostro se ha comprobado una mayor capacidad antioxidante así como niveles mayores de antioxidantes y ello disminuirá a medida que van pasando los días tras el nacimiento. Algunos autores lo han interpretado como una respuesta del organismo materno a las necesidades más elevadas de su hijo, en los primeros días de vida (Gossage et al., 2002)

La leche materna le da al recién nacido el mayor y más variado aporte de antioxidantes en relación a lo que cualquier dieta pueda ofrecerle en otras épocas de la vida. Los compuestos antioxidantes, mientras que en otras épocas de la vida dependen de la producción propia, como enzimas, coenzimas, prostaglandinas o factores inhibidores de enzimas pro-oxidantes, en la época neonatal son aportados por la leche materna. De ahí el importante papel protector de la leche materna respecto a la de fórmula (Friel et al., 2011).

Por último, destacar el hecho de que la capacidad antioxidante así como la presencia de algunos antioxidantes (α -tocoferol y GPx) se adapta a las necesidades específicas de los recién nacidos, siendo mayores en la leche de la madre de prematuros (Li et al., 2009).

4.2 LECHE HUMANA Y ESTRÉS OXIDATIVO

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son moléculas químicamente reactivas que contienen oxígeno. Normalmente son producidas en los organismos vivos a bajas concentraciones, y pueden ser beneficiosas o incluso cruciales en dichos seres vivos en múltiples procesos tales como la señalización intracelular y la defensa contra los microorganismos (Gülçin, 2012). Asimismo están implicadas en el crecimiento celular, la diferenciación, la progresión y la muerte (Granot y Cohen, 2004).

Las células que utilizan el oxígeno y, en consecuencia a las ROS, tienen que desarrollar complejos sistemas de defensa antioxidante para poder neutralizar a los ROS y protegerse contra los radicales libres dañinos (Sastre et al., 2000). Y si la producción de ROS excede a la capacidad de defensa antioxidante tiene lugar el estrés oxidativo.

Elevadas concentraciones de ROS pueden dañar a los principales componentes de las células tales como lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, lo que dará lugar a un deterioro funcional (Blokhina et al., 2003).

Tras el nacimiento, el recién nacido se expone a un ambiente extrauterino relativamente hiperoxigenado causado por un aumento de la biodisponibilidad de oxígeno, lo que dará lugar a una generación de ROS mucho mayor. Como resultado, se verá envuelto en una situación de estrés oxidativo debido especialmente a que los mecanismos de defensa antioxidante están poco desarrollados durante el período neonatal. De hecho se cree que el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades neonatales (Friel et al., 2004). Los recién nacidos pretérmino, que tienen su capacidad antioxidante aún más reducida, están expuestos a estrés oxidativo causado por infecciones, ventilación mecánica o nutrición parenteral. Esta es la razón por la que muchos de los trastornos que presentan los prematuros se cree que son debidos a dicho desequilibrio entre el estrés oxidativo y capacidad antioxidante. (Giribaldi et al., 2012)

La lactancia materna por su parte destaca por su papel protector en este desequilibrio pues se ha asociado con tasas más bajas de enterocolitis necrotizante, enfermedades respiratorias, y la retinopatía del prematuro, entre otras (Shoji et al., 2004).

4.3 PROPIEDADES DE LA LECHE MATERNA

El contenido de la leche humana va sufriendo cambios de una manera gradual a medida que va pasando por sus tres diferentes fases: calostro, leche de transición y leche madura. Dichos cambios ayudan al recién nacido a su adaptación fisiológica a la vida extrauterina.

El calostro es rico en proteínas, vitaminas liposolubles, minerales e inmunoglobulinas. Juega un papel fundamental en el neonato no solo desde el punto de vista nutricional, sino sobre todo por su papel protector frente a procesos infecciosos dado la inmadurez de su sistema inmune durante esta etapa. La leche de transición, en

cambio, contiene elevadas concentraciones de lípidos, lactosa, vitaminas hidrosolubles y más calorías que el calostro (Lawrence, 2011).

Dado que la leche es la única fuente de nutrientes para el neonato durante la primera etapa, además de proporcionar macronutrientes (proteínas, carbohidratos y lípidos) y agua, tiene el importante papel de suministrar suficientes vitaminas y minerales para el adecuado desarrollo del lactante. Además, la leche humana contiene varios compuestos bioactivos incluyendo numerosos factores inmunológicos, enzimas, factores de crecimiento y hormonas. Y posee mayor capacidad de eliminar los radicales libres en comparación con la leche de vaca (Hanna et al., 2004).

Respecto a los antioxidantes, pueden dividirse en 2 grandes grupos: enzimáticos y no enzimáticos. Ambos grupos ejercen una actividad sinérgica en la leche materna para erradicar los radicales libres (Fang et al., 2002).

Se ha visto que entre las múltiples ventajas de la leche materna respecto a la de fórmula, destaca su contenido en antioxidantes tanto hidrófilos como lipófilos, incluyendo ciertas vitaminas y gran variedad de enzimas antioxidantes. Por el contrario, la de fórmula está suplementada con escasos antioxidantes como, por ejemplo, la vitamina E. El exacto equilibrio de dichos antioxidantes en la leche humana es lo que determinará su estabilidad oxidativa (Perrone et al., 2007).

4.4 ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICOS EN LA LECHE HUMANA

Los antioxidantes no enzimáticos se pueden formar en el propio organismo del animal o necesitar ser suministrado a través de la dieta como nutrientes esenciales. Los que están presentes en la leche materna son glutatión, arginina, citrulina, taurina, creatina, selenio, zinc, coenzima Q10, vitaminas C, E y A. Hay algunos carotenoides que funcionan como provitamina A pero que también pueden comportarse como antioxidantes.

Mientras que la vitamina C actuaría en la fase acuosa, la vitamina E y coenzima Q lo harían en la fase lipídica. Hay otros antioxidantes no enzimáticos, como los flavonoides, que pueden actuar en ambas fases (Lindmark-Mansson y Akesson, 2000).

Los antioxidantes lipófilos tales como carotenoides, vitamina A y E presentan sus más altos niveles en el calostro y disminuyen durante la lactancia temprana, a pesar de que los lípidos totales aumentan. Se produce un mecanismo de transferencia asociada a lipoproteínas desde el plasma a la leche materna.

Los niveles de vitamina A en el tercer día puede ser tres veces mayor que la de la leche madura. Del mismo modo, los carotenoides en el calostro pueden ser diez veces mayores a los presentes en la leche madura, y la vitamina E puede ser de dos a tres veces mayor que en la leche madura (Macias y Schwiebert, 2001).

- **Ácido ascórbico o Vitamina C:** El ácido ascórbico está considerado como uno de los antioxidantes naturales más potentes y menos tóxicos, además de ser un eficaz agente reductor. Es fundamental en la salud y el desarrollo de los niños así como para la síntesis de colágeno, el cual se desarrolla rápidamente durante esta primera etapa de la infancia.

El ácido ascórbico se oxida fácilmente en el pH de la leche. La velocidad de oxidación está influenciada por factores como son la temperatura, la luz y la concentración de oxígeno.

El contenido medio en la leche humana madura es en torno a 40 mg/l frente a los 70 mg/l del calostro. Hay una gran variabilidad en éste de 30 a 100 mg/l con un descenso progresivo en el curso de la lactancia. En la leche de vaca dicha concentración es muy inferior, de 8 a 20 mg/l (Singh, 2004).

- **Vitamina E:** La vitamina E presenta diferentes formas (α , β , γ y δ -tocoferol) con diferente actividad biológica. El más activo de todos es el α -tocoferol. Sin embargo, estudios recientes muestran que hay otras isoformas de la vitamina E que también juegan un papel crucial en la salud del ser humano.

Esta vitamina actúa como un antioxidante liposoluble, protegiendo a los ácidos grasos poliinsaturados de la peroxidación. Juega un papel fundamental en el neonato pues durante esta etapa están expuestos a niveles de oxígeno más elevados que durante la vida intrauterina. Asimismo, juega un papel importante en la prevención

de las enfermedades cardiovasculares así como en diferentes tipos de cáncer (Moltó-Puigmartí et al., 2009).

La concentración de vitamina E en la leche de vaca es bastante baja, en torno a 0,9 mg/ml y es mayor en verano que en invierno. En cambio, la concentración en la leche humana es mayor, siendo de media 3 mg/l en la leche madura y 13 mg/l en el calostro.

Macías y Schweigert examinaron el calostro, leche de transición y leche madura y encontraron que los niveles de α -tocoferol eran más elevados en el calostro ($11,8 \pm 6,3 \mu\text{g/ml}$) con un descenso progresivo durante las primeras semanas de la lactancia ($2,7 \pm 1,1 \mu\text{g/ml}$) (Macias y Schwiebert, 2001).

Iniciar la lactancia materna de una forma precoz aumenta las reservas de vitamina E en el neonato, sobre todo teniendo en cuenta que no es capaz de atravesar la placenta en cantidades apreciables.

En el estudio de Quiles *et al*, se analizaron los niveles en leche humana de coenzima Q10, α , γ y δ -tocoferol así como la capacidad antioxidante total de la leche de niños prematuros y a término. Se concluyó que los niveles de α y γ -tocoferol eran más elevados en los nacidos a término (Quiles et al., 2006).

- **Vitamina A y Carotenoides:** La Vitamina A es un micronutriente de gran importancia para la salud humana. Hay dos formas por las que la madre puede transferirla a su hijo: la primera sería a través de la placenta durante la gestación y la segunda, a través de la glándula mamaria durante la lactancia. La transferencia es mucho mayor en el segundo caso, de hecho se llega a transferir hasta 60 veces más vitamina A durante 6 meses de lactancia respecto a la que se acumula en el feto durante los 9 meses de gestación (Dimenstein et al., 2003).

El calostro es especialmente rico en vitamina A, su contenido es aproximadamente de $2 \mu\text{g/ml}$. Además dicha vitamina es de muy fácil absorción por la presencia de la lipasa en la leche que ayuda a los niños a realizar bien la digestión lipídica.

Una fuente importante de vitamina A para los niños proviene de los carotenoides de la leche materna. Los niveles de carotenoides totales ($236,7 \pm 121,9 \text{ ng/ml}$) y

vitamina A ($1,02 \pm 0,56$ g/ml) son más altas en el calostro y se reducen significativamente durante las primeras semanas de lactancia, ($63,2 \pm 23,3$ ng/ml y $0,33 \pm 0,14$ g/ml, respectivamente) (Tijerina-Sáenz et al., 2009).

- **Lactoferrina:** La lactoferrina es una glicoproteína de 80 kDa compuesta por alrededor de 690 residuos de aminoácidos que participan en el sistema inmune del huésped y presentan una amplia variedad de actividades biológicas.

La leche humana, en contraste con la leche de vaca, contiene una elevada capacidad de fijación al hierro. Una proporción importante de hierro en la leche humana se une a lactoferrina, que es capaz de unirse a 2 iones férricos. La lactoferrina es bastante estable frente a la digestión proteolítica intestinal y se une a receptores específicos en la mucosa intestinal humana, de ahí su elevada biodisponibilidad. Además, la lactoferrina de la leche humana tiene propiedades anti-infecciosas (Hernell y Lönnerdal, 2002).

En el estudio realizado por Nagasawa *et al.*, la lactoferrina se midió inmunológicamente en el calostro humano y en la leche de 2 a 197 días después del parto. Los resultados mostraron que la lactoferrina se redujo durante las primeras dos semanas, seguida de un descenso posterior mucho más gradual. Así, los niveles medios de lactoferrina fueron de $4,9 \pm 0,6$ mg/ml, $4,5 \pm 0,8$ mg/ml y $1,6 \pm 0,3$ mg/ml en el calostro, leche de transición y la leche madura, respectivamente (Nagasawa et al., 1972).

- **Coenzima Q10:** La coenzima Q10 es un antioxidante intracelular que protege a los fosfolípidos de membrana, proteínas de membrana mitocondrial y lipoproteínas de baja densidad frente al daño oxidativo inducido por los radicales libres. Es considerada como un elemento esencial en la cadena respiratoria mitocondrial para la síntesis de ATP. Está presente en la leche materna de madres de recién nacidos a término en concentraciones superiores frente a las de pretérmino y disminuye a lo largo de la lactancia (Quiles et al., 2006).

Niklowitz *et al.* estudiaron su concentración en el calostro entre 24 a 48 horas después del parto, y de nuevo a los 7 (leche de transición) y 14 días después del parto (leche madura). En esos momentos, los niveles de CoQ10 encontrados fueron de 1,1, 1,0 y 0,9 mg/l, respectivamente. Las concentraciones más altas de CoQ10 soluble en grasas se encuentran en el calostro humano, a pesar de su bajo contenido de lípidos (Niklowitz et al., 2005).

4.5 ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

En la leche humana se ha demostrado la presencia de los siguientes antioxidantes enzimáticos: SOD (encargada de la dismutación del anión superóxido), catalasa (degradación de peróxido de hidrógeno – H₂O₂) y GPx (contiene selenio y cataliza el H₂O₂) (Zarban et al., 2009).

La catalasa destaca por sus efectos antiinflamatorios, debido a la degradación de H₂O₂, y la GPx es responsable de la disminución de la inflamación mediante la prevención de la peroxidación lipídica (Lawrence y Pane, 2007).

Lo que diferencia a las enzimas antioxidantes de la leche materna de las procedentes de otro origen es su estructura terciaria: son más hidrófobas y menos sensibles a la proteólisis y la desnaturalización, lo que se relaciona con su papel fisiológico en el sistema gastrointestinal del recién nacido (Kasapović et al., 2005).

- **Superóxido dismutasa (SOD):** La SOD cataliza la eliminación de los radicales superóxido O₂⁻ y protege a las células de los efectos potencialmente dañinos de la oxidación, según la siguiente reacción: $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$.

Está presente en todas las células con una concentración diferente en los distintos tejidos proporcional a la actividad metabólica de cada célula.

En los seres humanos hay tres formas de SOD: citosólica, mitocondrial y extracelular.

La leche de vaca contiene bajos niveles de SOD y está presente de forma exclusiva en la fracción de leche desnatada, mientras que la contenida en leche humana es entre

2 y 2,3 veces más elevada que la leche bovina, que a su vez es superior en el calostro respecto a la leche madura (Savić et al., 2005).

- **Catalasa:** La catalasa de la leche es una enzima cuyo peso molecular es 200 kDa y un pH isoeléctrico de 5.5; es estable en el rango de pH de 5 a 10 pero fuera de dicho rango pierde actividad rápidamente. La mayoría de catalasas son enzimas que contienen grupo hemo.

Son responsables de la siguiente reacción de dismutación: $2 \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$.

La actividad de la catalasa en la leche de vaca, determinada por un método polarográfico, fue de 1,95 U/ml mientras que en la leche humana es 10 veces superior a la leche bovina (Hirvi y Griffiths, 1998).

- **Glutación peroxidasa (GPx):** La GPx es una enzima que contiene selenio que contribuye a proteger a las células contra el daño de la peroxidación inducida por lípidos. Se encarga de catalizar la descomposición del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y del hidroperóxido orgánico (R-OOH) mediante glutación siguiendo la siguiente fórmula: $\text{R-OOH} + 2\text{GSH} \rightarrow \text{ROH} + \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O}$.

La leche contiene niveles bajos de glutación peroxidasa, y más del 90% estarán en forma extracelular. La función de dicha enzima en la leche no es del todo bien conocida y sólo se conoce que fija el 30% del selenio total (Torres et al., 2003).

Asimismo es muy variable su concentración según la dieta y también según la especie de la que proceda la leche siendo de mayor a menor: humana, caprina y bovina.

La actividad de esta enzima en la leche de vaca se ha detectado en niveles de entre 12 y 32 U/ml. Y dicha actividad se correlaciona directamente con la concentración de selenio.

Tanto la actividad de la GPx como la concentración de selenio en la leche humana van disminuyendo a medida que avanza la lactancia y alcanza su meseta al mes posparto (Fox y Kelly, 2006).

4.6 ANALISIS DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA

El estado antioxidante de las muestras biológicas puede ser analizado mediante la determinación de los componentes individuales del sistema o por la medición de la capacidad antioxidante total. Debido al hecho de que los sistemas antioxidantes actúan de forma sinérgica, un único análisis puede no reflejar el potencial total.

Hay muchos métodos para evaluar la capacidad antioxidante de los compuestos ensayados. Dos de los procedimientos de detección utilizados, que facilitan el análisis de varios antioxidantes, se utilizaron en el estudio de Zarban *et al.* La capacidad antioxidante total de las muestras se midió por el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) y la actividad de eliminación de radicales libres fueron evaluados utilizando el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) (Zarban *et al.*, 2009). La capacidad antioxidante total fue obviamente mayor en el calostro que en la leche de transición y madura. El test con DPPH mostró una mayor actividad erradicadora de radicales en el calostro ($50,4 \pm 19,7\%$).

La capacidad antioxidante de la leche humana obtenida a partir de 60 mujeres lactantes un mes después del parto fue analizada por método ORAC (oxygen radical absorbance capacity). El valor promedio de la capacidad antioxidante de la leche fue de $3,41 \pm 0,07 \mu\text{molTE/ml}$ (Tijerina-Sáenz *et al.*, 2009).

Respecto a los tocoferoles, el α -tocoferol fue el isómero principal encontrado en la leche con un valor medio de $2,32 \pm 0,11 \text{ g de leche/ml}$. La capacidad antioxidante de la leche humana se atribuyó de manera significativa a la presencia de α -tocoferol, de gran importancia al complementar al importante papel de la vitamina E como un eliminador de radicales en muchos otros sistemas biológicos.

Los niveles de CoQ10, α y γ -tocoferoles en la leche humana están directamente correlacionados con la capacidad antioxidante de la leche (Li *et al.*, 2009). Los antioxidantes presentes en la leche materna ejercen sinergismo en la erradicación de los radicales libres y ayudan a eliminar los radicales libres en el recién nacido.

En resumen, el estrés oxidativo está implicado en la patogénesis de numerosas enfermedades en el periodo neonatal. Por ello, uno de los objetivos debe ser minimizar

la producción de radicales libres así como promover el desarrollo de sistemas de defensa antioxidante.

La actividad antioxidante total en el calostro es superior a la presente en la leche de transición y leche madura. Por tanto, la leche humana es fundamental en la protección del recién nacido contra el estrés oxidativo.

5. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

La evidencia científica avala la superioridad nutricional de la leche materna (especificidad de nutrientes, máxima biodisponibilidad, aporte de células vivas: linfocitos y macrófagos, enzimas digestivas, inmunomoduladores, factores de crecimiento y receptores análogos) para la alimentación del recién nacido y lactante.

La leche humana contiene moléculas eliminadoras de radicales libres y múltiples componentes inmunomoduladores pero todavía no se han descrito todas las sustancias presentes ni tampoco las diferentes funciones de las mismas. Todo ello, junto con el hecho de que estas sustancias son producidas “de novo” en la glándula mamaria o son elementos provenientes del plasma materno, justificaría la importancia de este estudio al tratar de evaluar la influencia de los diferentes factores dietéticos sobre la calidad de la leche materna.

Por un lado, el adecuado estado nutricional materno tanto preconcepcional como durante la gestación y en la etapa postnatal es fundamental por su influencia en la modulación genética placentaria y su relación con obesidad, diabetes y otras enfermedades crónicas no transmisibles en la edad adulta (Ramakrishnan et al., 2012).

Se cree que la ganancia de peso durante la gestación actúa sobre la adiposidad del niño, directamente, mediante la programación intrauterina, e indirectamente, mediante el peso al nacer. Asimismo, se ha encontrado que una adecuada ganancia de peso durante el embarazo se asocia con bajos niveles de adiposidad en la descendencia. No obstante, los hijos de madres con sobrepeso u obesidad, tienen mayor cantidad de masa grasa al nacimiento (Hinkle et al., 2012).

La relación entre la alimentación durante el embarazo y la composición corporal de los recién nacidos, se ha investigado en modelos animales desde la década de los setenta (Pavey y Widdowson, 1975). La obesidad materna y el consumo excesivo de hidratos de carbono y grasas durante la gestación (Benkalfat et al., 2011), se encuentran asociados con riesgo de obesidad y diabetes de tipo 2 en etapas posteriores (Muhlhausler y Ong, 2011).

La mayor ingestión calórica antes del nacimiento y durante la infancia temprana, y el aumento de la ingestión durante el embarazo, promueven una ingestión excesiva en la etapa infantil, al igual que incrementan la predisposición a una mayor ganancia de peso y desarrollo de obesidad en etapas posteriores (Entringer, 2013).

Asimismo, las diferencias en la cantidad y la calidad de la dieta durante el embarazo juegan un papel importante en la transferencia de nutrientes a través de la placenta, en el desarrollo temprano del feto y en el incremento de la obesidad en la niñez (Ladino et al., 2014).

Por otro lado, hay múltiples evidencias respecto a que la composición de la leche materna presenta algunas diferencias regionales, fundamentalmente de ciertas proteínas, vitaminas y minerales. Ello podría explicarse básicamente por la dieta materna y el medio ambiente (Mena y Milad, 1998). Así pues, el conocimiento de la dependencia o no ya sea de la ingesta o bien de la reserva materna de nutrientes permitiría predecir el riesgo de su deficiencia en el lactante y en tal caso podría mejorarse mediante la adecuación nutricional o incluso la suplementación materna (Kuzawa, 2013). También destaca el hecho que la leche materna no tiene una composición estática sino que sus componentes cambian tanto durante el periodo de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura) como dentro de la propia toma (Maury-Sintjago et al., 2012). Al principio de ésta, la leche es más acuosa y rica en proteínas, vitaminas hidrosolubles, minerales y lactosa mientras que al finalizar es más grasa y rica en vitaminas liposolubles.

Por tanto esta investigación tratará de averiguar si la nutrición en la gestante influye en las características de su leche, principalmente en lo que respecta a la capacidad antioxidante. Si ello se lograra confirmar, se obtendría así una herramienta

muy útil, de tal forma que mediante el análisis y la posible modificación de la dieta no sólo se modificaría el metabolismo materno sino también la calidad de la leche con las importantes consecuencias positivas que ello supondría.

6. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Dado que la leche materna se trata de una secreción exocrina de compleja composición y que una pequeña parte de sus nutrientes dependerían directamente de la dieta, ello plantea la posibilidad de modificar su contenido.

En general, los micronutrientes y los ácidos grasos pueden estar más asociados con la dieta materna mientras que los macronutrientes parecen menos afectados por las variaciones nutricionales a corto plazo.

La alimentación de la madre no sólo durante la lactancia, sino también durante la gestación e incluso en la etapa preconcepcional, así como su estado nutricional parecen ser fundamentales debido a la posible influencia que ejercerían sobre la calidad y cantidad de la leche que segregan.

Pues bien, teniendo en cuenta las premisas anteriores, la hipótesis de esta investigación consiste en averiguar si la nutrición en la gestante influye en las características de su leche, principalmente en lo que respecta a la capacidad antioxidante.

7. OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo de investigación es el estudio de la posible influencia de la nutrición de la gestante sobre la calidad de su leche y su repercusión en el recién nacido.

Para lograr dicha finalidad, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- 1) Analizar el estado nutricional materno y su posible relación con parámetros analíticos maternos.
- 2) Evaluar la calidad y el contenido de la dieta de las mujeres lactantes.
- 3) Valorar la capacidad antioxidante de la leche humana.
- 4) Valorar las modificaciones de dicha capacidad antioxidante según las variaciones en la dieta materna.
- 5) Correlacionar los parámetros bioquímicos sanguíneos con la capacidad antioxidante de la leche.
- 6) Valorar la relación entre el estado oxidativo materno y la capacidad antioxidante de la leche humana.

METODOLOGÍA

1. DISEÑO

1.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio prospectivo que se realizó en madres sanas cuyo parto había tenido lugar en la Maternidad del Hospital Dr. Peset de Valencia y que habían decidido dar lactancia materna exclusiva a sus hijos desde el nacimiento.

Se ofreció participar en el estudio a todas aquellas madres que, además de haber dado a luz en dicha maternidad entre las fechas en las que se llevó a cabo el estudio, cumplían los criterios de inclusión. Previo a la aceptación de su participación, habrían recibido toda la información pertinente por escrito siguiendo en todo momento las condiciones éticas previstas.

1.2 POBLACIÓN DE ESTUDIO

Mujeres sanas ingresadas en sala de maternidad de Hospital Dr. Peset, de diferente origen y hábitos dietéticos (madres sanas de origen español, con dieta mediterránea, madres procedentes de América Latina y madres procedentes de los países de Europa del Este) que hubieran dado a luz a niños sanos, a término, de peso adecuado para su edad de gestación (AEG). El índice de partos en dicho hospital es cercano a 1500 partos/año y el porcentaje inicial de lactancia materna es del 82%.

No podían ser fumadoras y debían haberse comprometido a no tomar estimulantes (café, chocolate, etc.) durante el tiempo del estudio. Asimismo, no debían tomar suplementos vitamínicos ni minerales a parte del yodo y/o hierro que se administra habitualmente a las mujeres lactantes. Todas las madres habían firmado un consentimiento informado y se comprometían a alimentar a sus hijos con leche materna exclusiva durante el periodo de estudio.

1.2.1 Criterios de inclusión

- 1) Mujeres sanas, no fumadoras, con estadio nutricional normal y sin restricciones dietéticas específicas.

- 2) Que hayan dado a luz en Hospital Dr. Peset a niños sanos, a término y con peso adecuado para la edad gestacional con un test de Apgar mayor de 8 al minuto y mayor o igual a 9 a los 5 minutos.
- 3) Madres que aceptaron las condiciones del estudio: comprometerse a no tomar estimulantes (café, té, chocolate o vino) ni suplementos vitamínicos (a parte del yodo o hierro) durante el tiempo del estudio.
- 4) Madres que se comprometieran a alimentar a sus hijos con leche materna exclusiva.
- 5) Debían de haber firmado el consentimiento informado.

1.2.2 Criterios de exclusión:

- 1) Madres con hábitos tóxicos (tabaco, alcohol u otros) o toma estimulantes.
- 2) Necesidad de tomar medicación o suplementos vitamínicos o minerales.
- 3) No lactancia materna exclusiva.
- 4) Enfermedad materna o madre con necesidad nutricional específica.
- 5) Parto distócico o cesárea.
- 6) Problemas neonatales: prematuridad, bajo peso (menor 2500 g), necesidad de oxígeno suplementario o necesidad de algún suplemento aparte de la leche materna.

1.3 TAMAÑO MUESTRAL

Para realizar el cálculo del tamaño muestral se ha tenido en cuenta que se trabaja sobre una población finita (1.500 partos/año en Hospital Dr. Peset, de los que 82% darán lactancia materna). El tamaño muestral obtenido fue de 75 madres, calculando una potencia del 90%, decidiéndose finalmente incluir un total de 90 estimando posibles pérdidas durante el seguimiento.

1.4 REQUERIMIENTOS ÉTICOS

Cuando las madres son invitadas a la participación en el presente estudio, se les informa tanto verbalmente como por escrito de las condiciones del mismo así como de

los posibles inconvenientes. Para iniciar su participación tuvieron que firmar previamente el consentimiento informado pertinente. Asimismo se les informa que pueden desestimar continuar su participación en cualquier momento si así lo creyeran oportuno.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del departamento Dr. Peset.

La confidencialidad de datos de los pacientes participantes en el estudio ha sido respetada en todo momento. Los datos han sido almacenados en una base de datos excel a la cual sólo tenían acceso los investigadores del mismo. Además del número de historia, a los pacientes se les ha asignado un número asociado para facilitar su codificación.

La comunicación y cesión de los datos de todos los participantes fue ajustado a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal de acuerdo a lo establecido por la legislación mencionada.

1.5 SEGUIMIENTO DURANTE EL INGRESO EN MATERNIDAD

Durante la estancia en maternidad tanto de la madre como del recién nacido se realizaron varios contactos no sólo para llevarse a cabo las actividades previstas para el estudio sino también las actividades propias de supervisión del recién nacido. Desde el inicio se estableció un plan personalizado de cuidados tanto para la madre (observación de una toma al pecho) como para el bebé (exploración) ofreciéndoles el apoyo adecuado en base a sus necesidades individualizadas.

Todo ello se llevó a cabo en el primer / segundo día postparto:

- Captación: entrega de información sobre el estudio (anexo 1).
- Firma de consentimiento informado por las madres (anexo 2).
- Recogida de datos socio-demográficos, somatometría de la madre y datos antropométricos y perinatales del recién nacido (anexo 3).
- Recogida de un recordatorio de 24 horas de la dieta materna (anexo 4) así como registro prospectivo dietético durante 3 días (anexo 5).

- Obtención de muestras de leche, sangre y orina maternas y remisión inmediata al laboratorio de la Facultad de Medicina para congelación a -80 °C en menos de 2 horas.

1.6 VARIABLES

1.6.1 Variables independientes

1.6.1.a Variables generales

- Madre: edad, peso, talla, índice masa corporal, paridad, control del embarazo, enfermedades previas y durante la gestación, y nivel socioeconómico.
- Recién nacido: edad gestacional, peso, talla y perímetro cefálico al nacimiento.

1.6.1.b Variables nutricionales maternas

- Bioquímica sanguínea basal (puerperio inmediato):
 - Glucosa.
 - Urea.
 - Creatinina.
 - Hierro.
 - Calcio.
 - Fósforo.
 - Fosfatasa Alcalina.
 - Proteínas totales.
 - Colesterol Total, HDL, LDL y VLDL.
 - Triglicéridos séricos.
 - GOT, GPT, GGT.
 - Ácido úrico.
- Ingesta materna detallada:
 - Energía (Kcal/día).
 - Macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas).

- Micronutrientes:

- Vitamina A
- Vitamina B1, B2, B6 y B12
- Ac. Fólico
- Vitamina C
- Vitamina D
- Vitamina E
- Ca, P, Mg, Zn y Fe.

1.6.1.c Estado oxidativo materno:

a) Capacidad antioxidante total en plasma materno

Determinada por diferentes métodos.

- Método FRAP (*Ferric ion Reducing Antioxidan Power*)
- Método DPPH (*2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate*)
- Método ABTS (*2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*)

b) Antioxidantes en plasma materno

- Polifenoles
- α -tocoferol

c) Marcadores de daño oxidativo materno

- Malondialdehído: indicador de daño lipídico.
- Contenido en grupos carbonilo: indicador de daño a proteínas.
- 8-OH-diguanosina: indicador del daño al ADN.

1.6.2. Variables dependientes:

1.6.2.1. Capacidad antioxidante total en leche materna

Determinada por diferentes métodos.

- Método FRAP
- Método DPPH
- Método ABTS

1.6.2.2. Antioxidantes en leche materna

- Polifenoles
- Coenzima Q10

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MUESTRAS

2.1.1 Modo de recogida

Se realizó a todas las madres participantes la extracción sanguínea en ayunas así como la recogida de la primera micción coincidiendo la toma de ambas muestras el mismo día. La leche humana fue obtenida de dichas madres mediante el extractor eléctrico Symphony de Medela entre las 8 y las 10 h de la mañana. Se extraía de un pecho mientras la madre amamantaba del otro a su hijo.

2.1.2 Transporte, conservación y procesado

En cuanto las muestras eran obtenidas, se remitían mediante mensajería urgente al laboratorio del departamento. Las muestras maternas fueron procesadas y congeladas a -80 °C para hacer las correspondientes determinaciones bioquímicas. La leche materna precisó de dos centrifugados antes de su criocongelación en alícuotas: el primero de 10 minutos a 1000 rpm para separar los componentes celulares y el segundo, 25 minutos a 5000 rpm para obtener la leche desnatada que fue la que se analizó.

2.2 DATOS DIETÉTICOS

2.2.1 Registro retrospectivo de 24 horas

Se realizó el recuerdo dietético de las 24 horas previas (anexo 4) mediante entrevista personal en la sala de maternidad. Cada madre aportó de forma minuciosa todos los alimentos ingeridos el día anterior a la entrevista. Para obtener los datos con máximo detalle se utilizaron medidas comunes tales como cuchara, plato, vaso, etc.

Antes de realizar la recogida de datos, se les proporcionó a las madres una serie de instrucciones para optimizar la recogida de datos. El objetivo era anotar con la mayor precisión posible todos los alimentos y bebidas que se habían consumido en las 24 horas anteriores (Moreiras et al., 2015).

Lo habitual es comenzar por el desayuno del día anterior y continuar hasta completar el recuerdo de la dieta del día completo. Es importante no olvidar anotar los alimentos consumidos entre horas.

Había que escribir la calidad del alimento (leche entera o desnatada, pan blanco o integral, tipo de carne, aceite, etc.) y estimar la cantidad consumida en medidas caseras o en raciones (grande, mediana, pequeña). La información que figura en el envase de muchos alimentos puede ser muy útil para este fin.

No hay que olvidar anotar el aceite empleado en las preparaciones culinarias, el pan, el azúcar o las bebidas consumidas (refrescos y bebidas alcohólicas).

Asimismo, es muy útil registrar el método de preparación culinario (cocido, frito, asado, etc.) para estimar posteriormente la cantidad de aceite utilizado, si éste no se conoce con exactitud.

Para facilitar el recuerdo, se recomendaba escribir inicialmente el menú consumido en cada comida y luego describir detalladamente los ingredientes.

2.2.2 Registro prospectivo 3 días

Se realizó un registro dietético prospectivo de una manera minuciosa durante 3 días consecutivos, repasando con las madres en el momento de su entrega todos los datos aportados para aumentar así la precisión de los mismos (SENC, 2011).

Previo a su realización se entregaron instrucciones a seguir para lograr el registro lo más exacto posible. Se les indicaba que no debían cambiar su régimen habitual de comidas durante el mismo, debiendo anotar todas las comidas y bebidas ingeridas durante 3 días consecutivos, siendo uno de ellos festivo.

Para evitar que se olvidara algún alimento, se recomendaba anotar todo inmediatamente después de comer y era importante anotar los ingredientes de cada receta así como su forma de cocción.

El cuestionario (anexo 5) constaba de 2 páginas por día: en la primera se debía anotar todos los menús y procesos culinarios; en la segunda tenían que describir con detalle todos los ingredientes y cantidades (pesando o mediante medidas caseras: cucharada sopera, de postre, vaso de agua, vino, plato hondo, etc). Cada hoja debía estar

identificada con la fecha y el día de la semana. En la parte posterior de la hoja, tenían que anotar las recetas de los platos muy elaborados. Era importante indicar si el peso del alimento se refería al alimento crudo o cocinado, con o sin desperdicios. No había que olvidar indicar: azúcar, pan, aceite, tapas, refrescos, bebidas alcohólicas, dulces, chocolate, frutos secos, patatas fritas, etc. En cuanto a la descripción de los alimentos, era importante mencionar la calidad y tipo del alimento: tipo de leche, carnes, pescados, pan, mantequilla o margarina, etc. (Arbonés et al., 2003).

2.3 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.3.1 Encuestas dietéticas

Una vez obtenidos todos los datos dietéticos de las madres, se obtuvo su composición nutricional a través del análisis realizado con la aplicación informática Alimentación y Salud (BitASDE General Médica Farmacéutica).

2.3.2 Análisis de laboratorio

Se determinaron en las madres parámetros bioquímicos sanguíneos relevantes como los niveles de glucosa, hierro, transaminasas hepáticas, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol y fracciones, triglicéridos, calcio, fósforo, proteínas totales y fosfatasas alcalinas en la analítica rutinaria realizada en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Dr. Peset.

El estudio analítico de las muestras de leche se ha llevado a cabo en el Laboratorio del Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina determinando la capacidad antioxidante total de la leche humana y plasma materno (a través de los tres métodos de cuantificación de uso más extendido: FRAP, DPPH y ABTS), los antioxidantes contenidos en plasma y leche maternos así como los marcadores de daños oxidativo materno.

2.3.2.a Capacidad antioxidante total (en leche y plasma maternos)

Se realizaron las siguientes determinaciones para medir los niveles de actividad antioxidante total, tanto en la leche como en el plasma mediante 3 métodos diferentes: ABTS, DPPH y FRAP.

- **FRAP:** *Ferric Reducing Antioxidant Power*. Este método fue utilizado para medir el poder reductor tanto de la muestra de leche como la del plasma, basado en el método de Benzie y Strain (1996).

El mecanismo de acción del FRAP es de transferencia electrónica, basado en la reducción del complejo de la tripiridiltriazina férrica al complejo ferroso por un antioxidante a pH de 3,6 (Benzie y Szeto, 1996; Floegel, 2010).

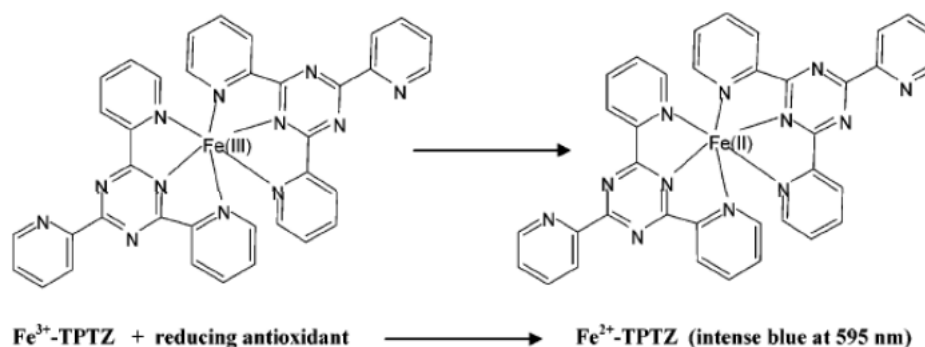


Fig 1: Reducción del reactivo FRAP

El reactivo FRAP se prepara mediante la mezcla de acetato sódico 300 mM a pH 3,6 (10 vol) + tripiridiltriazina (TPTZ) 10 mM en HCl 40 mM (1 vol) + Fe Cl₃.6H₂O 20 mM (1 vol).

A 30 µl de leche o 300 µl de sobrenadante (se diluyen 100 µl de suero en 900 µl de metanol y se toman 300 µl del sobrenadante) se le añaden 3 ml de dicho reactivo y se incuban a 37 °C durante 30 minutos. A continuación se centrifuga a 4000 rpm durante 10 minutos y finalmente se realiza la lectura espectrofotométrica a 593 nm. El cambio en la absorbancia se calcula y se relaciona con el de una solución estándar de Fe (II) y dicho incremento será directamente proporcional con la concentración de antioxidante. Los resultados son expresados como µmoles de Fe (II) usando una

recta de calibrado con diferentes concentraciones de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. (Benzie y Szeto, 1999).

Una unidad de FRAP se define como la reducción de 1 mol de ión férrico (Fe(III)) a ferroso (Fe(II)). (Huang et al., 2005)

- **DPPH**: Se siguió el método de Brand-Williams de 1995, usando el radical estable 2,2-diphenil-1-picrylhydrazyl que tiene su máximo de absorción a 517 nm. Se basa en su actividad secuestrante ya que es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables. Se trata del ensayo indirecto de la actividad antioxidante más antiguo.

Su uso en el estudio de los antioxidantes naturales está muy extendido ya que proporciona resultados en tiempo relativamente corto, es sencillo y sensible (Jin-wei, 2005). Fue usado por primera vez en 1958 por Blois y se basa en medir la capacidad de una muestra de captar radicales libres, su base es un reacción en la que tienen lugar al mismo tiempo tanto una transferencia de electrones como de átomos de hidrógeno. Dicho de otra forma, se basa en la teoría de que un antioxidante es un donador de hidrógeno y en el hecho que el DPPH es un aceptor de hidrógeno estable y así el efecto antioxidante será proporcional a la decoloración del DPPH en la muestra de estudio (Brand-Williams et al., 1995).

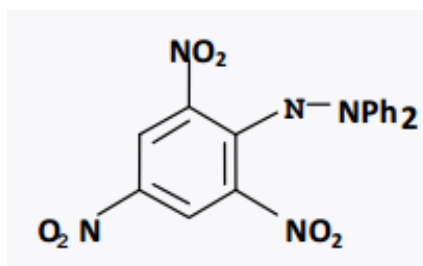


Fig.2: Estructura química del DPPH

Para preparar el reactivo se disuelve DPPH 1 mM se disuelve con etanol absoluto. A 1,420 ml de solución de DPPH se le añade 80 μl de leche o 100 μl de suero, por triplicado. Todo ello se incubaba a temperatura ambiente durante 30 minutos y a

continuación se centrifuga a 3000 rpm durante 5 minutos. Se finaliza mediante la lectura espectrofotométrica a 517 nm. Para estandarizar los resultados obtenidos de diferentes estudios, éstos son expresados en equivalentes de Trolox utilizando una curva de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox. La actividad antioxidante de una muestra se expresará en μ moles de equivalentes de Trolox por 100 g de muestra (Joon-Kuan et al., 2009).

- **ABTS**: determinará la capacidad antioxidante total siguiendo el método ABTS de Miller y Rice Evans de 1997, modificado por Pellegrini en 1999. Está basado en la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) diamónica del ácido sulfónico) por el persulfato potásico para formar el radical ABTS, el cual es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno.

Este método es ampliamente utilizado para valorar la actividad antioxidante debido a su utilidad tanto en fase acuosa como grasa y a que proporciona unos resultados rápidos y reproducibles si se lleva a cabo con el equipo de laboratorio adecuado. (Dudonne et al., 2009).

A través de este método se mide la capacidad que tiene una muestra de captar radicales libres, por tanto se trata de una reacción de transferencia de electrones. Su fundamento es vigilar la reducción del radical catiónico ABTS* producida por la oxidación del 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS) causada por la adición de una muestra que contiene antioxidantes (Roginsky y Lissi, 2005).

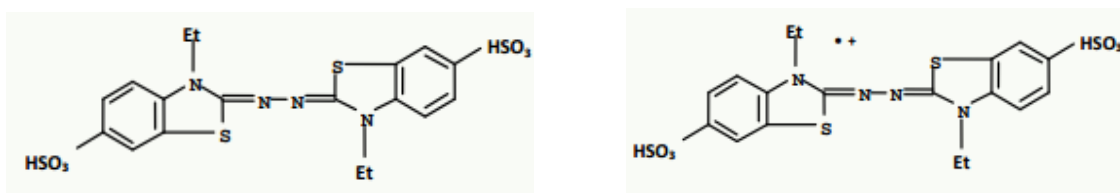


Fig. 3: Estructura química del ABTS y del radical ABTS*

En nuestro estudio, la generación del reactivo ABTS*, se realizó mezclando ABTS 7mM con la solución de persulfato potásico 2,45 mM en una proporción 1:1 v/v. Se

determinó la actividad antioxidante total mediante espectrofotometría a 734 nm añadiendo alícuotas de las muestras (10 µl de plasma y 30 µl de leche materna) en 3 ml de reactivo ABTS*. 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 (Nilsson et al., 2005).

La capacidad antioxidante equivalente de Trolox hace referencia a los µmoles de Trolox necesarios para desarrollar la misma capacidad antioxidante que un gramo de muestra. Cuanto mayor sea el número de equivalentes de Trolox, más antioxidante será la muestra. Aunque no tiene ningún significado fisiológico, su uso está muy extendido y es útil para comparar los datos de estudios publicados (Pérez-Jiménez et al., 2011).

2.3.2.b Antioxidantes en leche materna

- Polifenoles totales: para determinar la cantidad total de polifenoles se usó el método de Folin-Ciocalteu. La reacción de Folin-Ciocalteu está basada en la oxidación de los polifenoles con el reactivo de Folin, formando un complejo azul que se mide espectrofotométricamente a 750 nm.

Para cada determinación, en un tubo se mezclaron 100 µl de leche con 2 ml de acetona/agua/ácido acético 70/28/2 v/v/v. Esta mezcla fue sonicada 3 veces y luego fue centrifugada y ello se repitió en 4 ocasiones. Del sobrenadante obtenido, se toman 100 µl y se añaden 500 µl de Folin-Ciocalteu y 400 µl de Na₂CO₃ (dilución 1/10). Tras incubación a temperatura ambiente durante 40 minutos, la absorbancia de la muestra se determinó espectrofotométricamente a 750 nm, utilizando como estándar el ácido gálico.

- Coenzima Q10: El contenido en coenzima Q10 de la leche materna se determinó mediante la técnica de Tang (Tang et al., 2006) de detección electroquímica mediante cromatografía líquida de alta resolución. A 1mg/ml de proteína (250 µL de suspensión) se añadieron 750 µl de una mezcla de hexano y etanol en proporción 5:2 v/v. Ésta fue agitada durante 1 minuto y centrifugada a 3.000 rpm durante 3 minutos.

La fase de hexano (400 µl) fue recogida en un tubo limpio. Dicho proceso fue repetido 3 veces. Finalmente se recogió la fase hexano así obtenida y se añadió al tubo anterior. El extracto de exano se evaporó con N₂. A continuación, la muestra se resuspendió con 200 µl de etanol y se inyectaron 50 µl de la misma. Para la recta de calibrado se utilizó Coenzima Q9 y Coenzima Q10 resuspendidas en etanol y con una pequeña cantidad de cloroformo para mejorar su disolución. Se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas: columna C18 de fase reversa de 25 cm x 4.6 cm; precolumna de 15 cm x 4.6 cm; fase móvil: 7.0 g de NaClO₄.H₂O en 1000 ml de Etanol-Metanol-70% HClO₄ en proporción 900:100:1, v/v/v; velocidad de flujo: 1 ml/minuto y lectura a una absorbancia de 275 nm.

2.3.2.c Antioxidantes en plasma materno

- Polifenoles totales: 200 µl de plasma se centrifugaron a 12.000 g durante 5 minutos. Se tomaron 150 µl del sobrenadante y se mezclaron con 30 µl de ácido metafosfórico 1.32 M, para precipitar completamente las proteínas, y se centrifugaron a 2.700 g durante 3 minutos y se recogió el sobrenadante. A 20 µl de sobrenadante se le añadieron hasta 100 µl de agua destilada. A continuación, se añadió 500 µl del reactivo de Folin-Ciocalteau (1/10) y 400 µl de solución de carbonato de sodio al 7,5%, se incubó a temperatura ambiente durante 40 minutos y se leyó a 750 nm.
- α-Tocoferol: se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución de Arnaud et al., 1991. Se tomaron 200 µl de plasma y se mezclaron con 100 µl de etanol. Se añadieron 500 µl de hexano, se centrifugaron y se recogió la fase orgánica, la cual se llevó a secado con N₂ seco y finalmente se resuspendió con 200 µl de fase móvil (diclorometano/acetonitrilo /metanol, 20:70:10). Se midió a 291 nm.

2.3.2.d Marcadores de daño oxidativo materno

Se llevó a cabo la determinación de los siguientes marcadores de daño oxidativo tanto en plasma como en orina maternos:

- MDA: Para su medición se siguió la técnica de Mateos et al. Este método está basado en la determinación con cromatografía líquida de alta resolución de un derivado 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNPH). Se tomó un volumen de 250 μL de plasma y se mezcló con 50 μL de NaOH 6 M. Se incubó a 60°C durante 30 minutos, para que se produjera la hidrólisis alcalina de los enlaces del MDA con las proteínas presentes en las muestras. Posteriormente, se añadió 125 μL de ácido perclórico 35% (V/V) y se centrifugó a 2.800 g durante 10 minutos para una mejor precipitación de las proteínas. Se transfirieron 250 μL de sobrenadante a un eppendorf y se le añadieron 25 μL del reactivo derivatizante DNPH 5 mM con ácido clorhídrico 2 M. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz. Finalmente se inyectaron 50 μL al cromatógrafo.
- Grupos carbonilo: se realizó la determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas plasmáticas y orina maternas. 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 tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina. La cantidad de proteína utilizada oscila entre 0,5–1 mg/ml, añadiendo tampón de conservación de mitocondrias hasta 1 ml de volumen final. Se centrifugó a 13.600 rpm durante 10 minutos y al sobrenadante se le añadió estreptomina sulfato 10% con tampón Hepes 50 mM pH:7,2, en una proporción de 1/9 v/v. Se volvió a centrifugar y tras ello, se cogieron 200 μL del sobrenadante y se añadió 400 μL de 2,4 dinitrofenilhidracina (DNFH) 10 mM /CIH 2,5 M a las muestras y 400 μL de CIH 2,5 M a los controles. Se incubó 1 hora a temperatura ambiente, con agitación ocasional. A continuación se volvió a centrifugar pero ahora a 12.600 rpm durante 3 minutos y se añadió 1 ml de ácido tricarbóxico al 20%. Se centrifugó de nuevo a 12.600 rpm durante otros 3 minutos. Se recogió el pellet y se lavó 3 veces con 1 ml de etanol: acetato de etilo (1:1 v/v). Se volvió a centrifugar otra vez a 12.600 rpm durante 3

minutos y se recogió el pellet. Finalmente, se añadió 1 ml de guanidina 6 N a pH: 2,3, se centrifugó a 12.600 rpm y se midió el sobrenadante a una longitud de 366 nm frente a una solución de guanidina.

- 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG): se realizó la determinación de la 8-OHdG en el ADN de las células sanguíneas y en orina maternos. Para ello se utilizó el kit de la 8-OHdG-EIA-BIOTECH como sigue: a una placa en la cual estaba fijada la 8-OHdG, se añadió el anticuerpo monoclonal de 8-OHdG y la muestra o estándar. La 8-OHdG en la muestra o estándar competía con el 8-OHdG unido a la placa por los sitios de unión del anticuerpo monoclonal de 8-OHdG. Los anticuerpos que se iban uniendo a la 8-OHdG de la muestra fueron lavados, mientras que aquéllos que se habían unido a la 8-OHdG de la placa permanecían. Posteriormente, se añadió el anticuerpo secundario marcado con la enzima, el cual se unió al anticuerpo monoclonal que permaneció en la placa. El anticuerpo secundario marcado con enzima que no se había unido, sería eliminado mediante un proceso de lavado. Finalmente, se le añadió un cromógeno y la intensidad de coloración era proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la placa.

2.3.3 Análisis estadístico

Se ha realizado el análisis estadístico de los datos mediante el programa SPSS versión 17 para Windows. Se realizó un análisis descriptivo de cada variable estudiada y se ha estudiado la normalidad de sus distribuciones con el test de Kolmogorov con la corrección de Lilliefors. El tratamiento estadístico de las variables asimétricas se ha realizado mediante transformación logarítmica. Las asociaciones entre las diferentes variables analizadas y los resultados de la capacidad antioxidante total de la leche materna se estimaron mediante la correlación no paramétrica de Spearman (ρ). La significación estadística se estableció en $p < 0,05$.

RESULTADOS

1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES

En la tabla 1 se describen las características generales de los participantes del estudio: edad de la madre, talla, peso al inicio y final de la gestación y el índice de masa corporal (IMC) correspondiente en ambos momentos, edad gestacional en el momento del parto así como peso del recién nacido.

TABLA 1: CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES (n = 90)

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA \pm DS
EDAD (años)	18 - 42	30,29 \pm 5,03
PESO PREGESTACIONAL (kg)	42 - 95	61,56 \pm 9,27
PESO PREPARTO (kg)	55 - 114	73,63 \pm 10,36
TALLA (cm)	148 - 174	162,06 \pm 5,78
IMC PREGESTACIONAL (kg/m ²)	16,42 - 30,10	23,31 \pm 2,97
IMC PREPARTO (kg/m ²)	21,30 - 35,65	27,88 \pm 3,41
EDAD GESTACIONAL (semanas)	38 - 42	39,49 \pm 1,07
PESO RECIÉN NACIDO (g)	2,540 - 4,180	3300,00 \pm 390,01

La edad media de las madres participantes fue de 30,29 años lo cual es extrapolable a lo que acontece a nivel nacional puesto que según el Instituto Nacional de Estadística la edad media de maternidad a nivel nacional en 2015 fue de 30,67 años.

El índice de masa corporal medio antes de la gestación fue de 23,3 kg/m² con el correspondiente aumento al final de la misma obteniéndose en el estudio una media de 27,88 kg/m².

La edad gestacional media fue de 39,49 semanas lo que era esperable puesto que entre los criterios de inclusión se incluía ser un parto a término.

Respecto al peso del recién nacido todos los niños incluidos eran de peso adecuado a su edad gestacional.

2. PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DE SUERO MATERNO

En la siguiente tabla (tabla 2) se muestran las determinaciones bioquímicas que se obtuvieron en el suero materno mediante la realización de extracción sanguínea en el primero o segundo día postparto.

TABLA 2: PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN SUERO MATERNO (n = 90)

	INTERVALO (MÍN- MÁX)	MEDIA ± DS
GLUCOSA (mg/dl)	57 - 128	74,48 ± 10,87
UREA (mg/dl)	11 - 37	22,47 ± 6,01
CREATININA (mg/dl)	0,5 - 0,85	0,63 ± 0,08
ÁC.ÚRICO (mg/dl)	1,7 - 6,4	4,17 ± 0,92
COLESTEROL TOTAL (mg/dl)	145 - 372	230 ± 44,19
HDL-COLESTEROL (mg/dl)	30 - 89	58,29 ± 11,64
LDL-COLESTEROL (mg/dl)	44 - 233	135,72 ± 35,68
VLDL-COLESTEROL (mg/dl)	15 - 63	35,03 ± 11,13
TRIGLICÉRIDOS (mg/dl)	76 - 477	175,04 ± 63,92
GOT (UI/L)	8 - 35	21,14 ± 5,97
GPT (UI/L)	3 - 51	17,77 ± 6,41
GGT (UI/L)	5 - 56	14,21 ± 8,18
PROTEINAS TOTALES (g/dl)	4,8 - 6,8	5,81 ± 0,41
CALCIO (mg/dl)	8 - 10,1	8,72 ± 0,42
FÓSFORO (mg/dl)	2,9 - 5,5	4,06 ± 0,61
HIERRO (mcg/dl)	17 - 144	49,59 ± 22,81
FOSFATASAS ALCALINAS (UI/L)	48 - 235	136,66 ± 37,07

La función renal de las participantes se encontraba en todas en rango de normalidad siendo la media de urea de 22,47 mg/dl, creatinina de 0,63 mg/dl y de ácido úrico 4,17 mg/dl.

Durante el embarazo pueden producirse alteraciones fisiológicas en la biología hepática en las que no habrá alteraciones de los niveles de transaminasas como ocurre en nuestra muestra, donde dichos niveles se encuentran normales, al contrario que lo que ocurre en las enfermedades hepáticas asociadas al embarazo como son la colestasis intrahepática, la hiperémesis gravídica, el hígado graso agudo y la preeclampsia, en las que existe una alteración de las pruebas hepáticas. El valor medio de las aminotransferasas y de GGT de la población estudiada estuvo dentro de los límites normales. (Bellot et al., 2008)

El perfil lipídico suele verse alterado durante la gestación siendo habitual la elevación no sólo de los triglicéridos, sino también del colesterol que puede llegar hasta

a multiplicarse por dos respecto a sus niveles habituales. En nuestra muestra se presenta una discreta elevación de estos parámetros (Brea, 2011).

La fosfatasa alcalina está comúnmente aumentada durante el embarazo. Sus niveles máximos pueden alcanzar entre 2 y hasta 4 veces su valor normal al llegar a término. El origen principal de este incremento reside en la placenta aunque su mecanismo completo no es del todo conocido. El nivel medio en las participantes de nuestro estudio fue de 136,66 UI/l en un rango entre 48 y 235 UI/l cuando los niveles considerados de normalidad es de 44 a 147 UI/l por lo que no se mostraron por tanto muy elevados en esta muestra (Doshi y Zucher, 2013).

La anemia por deficiencia de hierro constituye la carencia nutricional de mayor prevalencia durante el embarazo. Según la OMS, hasta un 30 % de las mujeres embarazadas presentan deficiencia de hierro. Aunque ello ha mejorado en los últimos años debido a la suplementación habitual de vitaminas y minerales así como los controles analíticos frecuentes realizados durante el embarazo. En nuestra muestra, los niveles medios de hierro en plasma materno fue de 49,59 $\mu\text{g/dl}$ que estaría en rango normal pero hay que tener en cuenta que un total de 36 de las 90 madres participantes (lo que supone un 40 % de la muestra) presentaban ferropenia, llegando incluso a encontrarse en algunas pacientes valores mínimos de hasta 17 $\mu\text{g/dl}$ lo que se trataría de una ferropenia franca (Gay, 2008).

3. INGESTA DIETÉTICA MATERNA

Por un lado, se llevó a cabo el registro dietético retrospectivo. Se realizó el recuerdo dietético de las 24 horas previas mediante entrevista personal en la sala de maternidad. Antes de realizar la recogida de datos, se les proporcionó a las madres una serie de instrucciones para optimizar la recogida de datos. El objetivo era anotar con la mayor precisión posible todos los alimentos y bebidas que se habían consumido en las 24 horas anteriores.

Por otro lado, se recopiló el registro prospectivo durante 3 días consecutivos, repasando con las participantes en el momento de su entrega todos los datos aportados para aumentar así la precisión de los mismos. Se les indicó que no debían cambiar su

régimen habitual de comidas durante el mismo, debiendo anotar todas las comidas y bebidas ingeridas durante 3 días consecutivos, siendo uno de ellos festivo.

De cada participante por tanto se obtuvo el registro dietético de un total de 4 días, se analizaron de forma pormenorizada mediante la aplicación informática Alimentación y Salud (BitASDE General Médica Farmacéutica) para lograr así una estimación de su ingesta habitual. Ello ha sido resumido en la tabla 3 donde se muestra el análisis dietético en conjunto así como los micro y macronutrientes por separado.

Los requerimientos calóricos diarios en una mujer embarazada están incrementados, y además debe tenerse en cuenta el estado nutricional previo. De tal forma que si tienen una actividad moderada, y el estado nutricional es normal los requerimientos diarios son 30 kcal/kg por lo que para una mujer media (peso de 60 kg) serían 1800 kcal/día. Si presenta desnutrición dichas necesidades aumentan a 35-40 kcal/día por lo que el aporte ideal sería 2400 kcal/día. Y al contrario, en caso de obesidad, 25 kcal/día por lo que el aporte diario ideal sería de 1500 kcal/día.

A estos requerimientos basales se les añadirá a partir de la semana 20 de gestación y hasta el final de la misma 100 kcal/día, y 500 kcal/día en el postparto y durante toda la lactancia. La proporción de nutrientes debe ser de 55% de carbohidratos, 30% de grasas y 15% de proteínas, siendo por tanto una dieta variada y equilibrada, al igual que en la mujer no embarazada (Cuco et al., 2006).

Para poder realizar una evaluación de la idoneidad de las dietas de las pacientes del estudio, se ha calculado la ingesta de macronutrientes en forma de porcentaje del total de las kilocalorías ingeridas diarias. De esta forma se han obtenido las siguientes proporciones en lo que a la composición de macronutrientes se refiere: el 17,4% de las calorías aportadas ha sido en forma de proteínas (392 kcal de media), el 45,2 % de hidratos de carbono (1000 kcal) y el 37,4 % de las grasas (828 kcal).

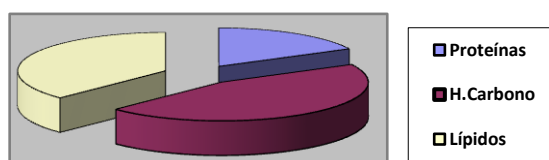


Fig. 4: Dieta materna según proporción de macronutrientes

TABLA 3: ANALISIS DE LA DIETA MATERNA (n = 90)

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA ± DS	RDI *
ENERGÍA (kcalorías)	1453,78 – 3054,34	2194 ± 326,21	1° trim: 2400 2° trim: 2700 3° trim: 2850
PROTEINAS (g)	57,4 – 180,09	97,59 ± 18,97	70
HIDRATOS DE CARBONO (g)	14,95 – 421,74	250,11 ± 53,94	175
GRASAS (g)	41,83 – 330,04	91,80 ± 33,17	35
AG MONOINSATURADOS (g)	15,84 – 60,6	36,16 ± 10,99	52
AG POLIINSATURADOS (g)	3,91 – 88,85	11,23 ± 9,06	13
AG SATURADOS (g)	13,22 – 60,01	31,89 ± 9,59	20
COLESTEROL (mg)	120,35 – 917	361,34 ± 144,85	240
FIBRA (g)	11,75 – 55	21,48 ± 7,20	25
VITAMINA A (µg)	33,92 – 2409	924,27 ± 421,27	770
VITAMINA B1 (µg)	0,84 – 19,06	2,15 ± 2,01	1.4
VITAMINA B2 (µg)	1,13 – 6,63	2,15 ± 0,78	1.4
VITAMINA B6 (mg)	1,1 - 46,94	2,81 ± 4,78	1.9
VITAMINA B12 µg)	2,2 - 59,45	7,77 ± 6,57	2.6
VITAMINA C (mg)	20,95 - 1839,92	146,92 ± 191,42	85
VITAMINA D (µg)	0,04 - 14,42	2,64 ± 2,35	15
VITAMINA E (mg)	2,12 - 35,66	9,02 ± 4,79	15
NIACINA (mg)	1,64 - 56,4	34,24 ± 9,67	18
Ácido PANTOTÉNICO (mg)	2,66 - 10,1	5,69 ± 1,85	6
BIOTINA (µg)	1,05 - 69,4	19,22 ± 18,21	30
ÁCIDO FÓLICO (µg)	1,28 - 744	291,89 ± 117,36	600
SODIO (mg)	6,27 - 4620,97	2280,71 ± 647,72	1500
POTASIO (mg)	27,45 - 5985	3575,88 ± 963,79	4700
CALCIO (mg)	193,79 - 1745,76	1062,63 ± 299,55	1300
FÓSFORO (mg)	692,91 - 2466	1537,72 ± 362,35	700
MAGNESIO (mg)	196,48 - 1921,86	393,81 ± 182,16	350
HIERRO (mg)	8,42 - 38,59	15,68 ± 4,62	27
ZINC (mg)	4,4 - 47,5	11,80 ± 6,72	11
YODO (mcg)	29,76 - 236	102,75 ± 42,51	220
COBRE (mg)	0,3 - 73,96	11,51 ± 20,41	100
CLORO (mg)	504,1 - 3944	2000,84 ± 800,87	3000
MANGANESO (mg)	0,68 - 47,97	8,25 ± 8,67	2
SELENIO (mg)	44,71 - 175	91,93 ± 30,14	60

* RDI = Recommended Daily Intake (cantidad diaria recomendada) de las últimas guías de Nutrición, de 2010, en este caso aplicada a la etapa gestacional.

http://www2.uned.es/pea-nutricion-y-dietetica-I/guia/guia_nutricion/recom_tablas_RDA.htm?ca=n0

Teniendo en cuenta estas premisas, y dado que mayoritariamente las pacientes incluidas en el estudio tenían un índice de masa corporal correspondiente a normopeso, en el postparto los requerimientos ideales serían $1800 + 500 = 2300$ kcal al día lo cual coincide con la media de kilocalorías diarias de nuestra muestra que fue de 2194 kcal/día (Navarrete-Muñoz y Giménez, 2010).

En el caso de la mujer embarazada, si bien hemos comentado que en cada trimestre de la gestación se debe incrementar el aporte calórico total, se recomienda mantener aproximadamente las mismas proporciones que la población general para poder llevar a cabo así una dieta equilibrada (Cuervo et al., 2009).

MACRONUTRIENTES DIETA MATERNA

Por tanto, para la analizar la ingesta de macronutrientes de nuestra muestra, se comparó con los rangos recomendados de ingesta, que son aquellos definidos como seguros (por debajo del rango inferior se podría incurrir en déficit y por encima aumenta el riesgo de enfermedades crónicas). Se observó que la ingesta media de kilocalorías procedentes de proteínas fue del 17.4% (muy similar a lo recomendado que era el 15%) sin observarse en la muestra ningún caso de ingesta inferior al 10% (dietas hipoproteicas) o superior al 35% (dietas hiperproteicas) de la ingesta calórica total. En relación al consumo de hidratos de carbono, la media muestral se halla en 45,2%, muy por debajo de las RDI actuales del 55%. Tan sólo un 5% de las participantes ingirieron un 55% o superior del total de kilocalorías en forma de hidratos de carbono y hasta un 48% realizaban una dieta habitual pobre en carbohidratos, muy por debajo del límite inferior de normalidad del 45%.

Respecto a la ingesta de grasas, el 82% de las madres participantes en el estudio realizaban una ingesta media grasa superior al 30% de las kilocalorías totales

recomendado siendo la media de ingesta grasa del 37,4%. Y hasta un 54% llegaron a superar el rango superior recomendado del 35%. En referencia al a proporción de ácidos grasos, todas ellas tuvieron un consumo relativo de Ácidos Grasos (AG) Poliinsaturados menor al 30%, el de AG Monoinsaturados mayor del 35% y el de AG Saturados mayor del 30%. Dicho de otra forma, se constató un consumo desequilibrado de ácidos grasos entre las mujeres estudiadas a costa de un consumo excesivo de AG saturados y monoinsaturados en detrimento del consumo de AG poliinsaturados. Ello es muy importante por su posible repercusión tanto en la propia salud de las madres como su influencia en la composición de la leche materna. Se sabe que la composición en ácidos grasos de la leche materna varía en relación con la composición grasa de la dieta materna y también juega un papel fundamental sobre el desarrollo del sistema nervioso y como inmunomodulador.

Ello tiene connotaciones muy importantes y nos debe hacer reflexionar que se ha de tener especial cuidado en la dieta de las embarazadas. El objetivo sería tratar de conseguir que sea lo más equilibrada posible, recomendando incrementar el aporte de hidratos de carbono, en forma fundamentalmente de azúcares complejos, y disminuir el de grasas, sobre todo las saturadas (Mariscal-Arcas et al., 2009).

Respecto a la fibra, durante el embarazo se incrementa el aporte diario recomendado siendo aproximadamente de 25 g/día mientras y en el caso que asociara diabetes gestacional esta recomendación se elevaría hasta 40 g/día. En las participantes en el estudio la media de aporte diario de fibra es de $21,5 \pm 7$ g por lo que se asemeja a lo recomendado (Ortiz-Andrellucchi et al., 2009).

MICRONUTRIENTES DIETA MATERNA:

A. Vitaminas

El aporte de muchos de los micronutrientes de la dieta materna es deficitario en nuestra muestra. Más de un 90% de las madres estudiadas estaban en riesgo de un aporte deficitario de ácido fólico. Este hecho quedaría solucionado por la práctica habitual de suplementar la dieta de la mujer embarazada y lactante con suplementos vitamínicos y especialmente con ácido fólico. Es fundamental dado que el déficit de esta

vitamina en la mujer durante las primeras semanas de la gestación podría tener fatales consecuencias sobre el desarrollo fetal. Por el contrario, el aporte de otras vitaminas como A, B1, B2, B6 y B12 parece estar asegurado pues apenas un 10 % de la muestra alcanzó niveles bajos.

B. Minerales

Respecto a los minerales destacar la tendencia en aproximadamente un 40% de la muestra a exceder las RDI en el aporte dietético de sodio, fósforo, manganeso y selenio mientras hay una tendencia al déficit del aporte en un 35% de los casos de hierro y cobre, a tener en cuenta por su gran influencia en los procesos oxidativos.

4. ESTADO OXIDATIVO (I): MEDICIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE

4.1 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL PLASMA MATERNO

Para mantener un equilibrio y evitar el daño oxidativo, nuestro cuerpo cuenta con sistemas de defensa biológica contra los radicales libres que por un lado tiendan a impedir su formación y por otro, lo neutralicen una vez formados (capacidad antioxidante). Esta función pueden llevarla a cabo mediante la presencia de macromoléculas que evitan la acción de los radicales libres, de enzimas antioxidantes (como la SOD), antioxidantes endógenos (glutación, ácido úrico) y antioxidantes exógenos (vitamina E por ejemplo).

Un desajuste entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la defensa antioxidante, a favor de las primeras, provocan un daño orgánico conocido como estrés oxidativo. Ello conlleva una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos que ocasionan el deterioro y muerte celular, por lo que hoy en día existen ensayos bioquímicos que sirven como indicadores para evaluar la capacidad antioxidante total de la persona e investigar la relación que pueda existir en diversas patologías (Calvo y López, 2011).

La evaluación de la capacidad antioxidante de plasma materno de las participantes en el estudio fue llevada a cabo mediante tres métodos diferentes: FRAP, ABTS y DPPH (tabla 4).

Hay que recordar que el método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) descrito por primera vez por Benzie y Strain en 1996, se basa en determinar la capacidad de una muestra con la molécula Tripiridil s-triazina (TPTZ) de férrico (Fe^{3+}) a ferroso (Fe^{2+}). De esta manera se genera una coloración azul cuya intensidad será proporcional a la capacidad reductora de la muestra que podrá cuantificarse por colorimetría (593 nm) en base a un patrón de sulfato ferroso. Dicho en otras palabras, la capacidad de reducir el hierro se considera un índice del poder antioxidante de la muestra. Es un método sencillo y fácilmente automatizable.

Por otro lado estaría el método ABTS, descrito por Miller y Rice-Evans en 1993. El ABTS es un compuesto cromógeno de color azul/verdoso cuya máxima absorción se da a los 342 nm. Es soluble en agua y en disolventes orgánicos. El radical $ABTS^+$ una vez que es generado (enzimática o químicamente) presentará nuevas características con diferencias en su absorción. Puede llevarse a cabo por dos vías diferentes: Inhibición (los antioxidantes se añaden previamente a la generación del radical ABTS, y se determina la inhibición en la formación del radical, que se traduce en un retraso en la aparición de la coloración verdeazulada) o Decoloración (los antioxidantes se añaden una vez formado el radical ABTS, y se determina la disminución de la absorbancia debida a la reducción del radical).

Y por último, hay que recordar que el método DPPH, descrito por Berset en 1994. Se basa en la reducción del radical DPPH por los antioxidantes de la muestra. El radical es estable y tiene una coloración púrpura que se pierde progresivamente cuando se añade la muestra conteniendo sustancias antioxidantes. La decoloración del radical se determina a 515 nm y la cuantificación se realiza empleando soluciones patrón de ácido ascórbico. Es un método rápido y sencillo, que no requiere de un equipamiento sofisticado. A diferencia del ensayo ABTS (TEAC), éste no será necesario generar el radical puesto que el DPPH se comercializa. En algunos casos su interpretación se

complica, ya que algunos antioxidantes/moléculas pueden causar interferencias si poseen un espectro de absorción similar al DPPH.

TABLA 4: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE PLASMA MATERNO
ANALIZADA POR 3 MÉTODOS DIFERENTES

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA \pm DS
FRAP-PLASMA (mmol/l)	695,22 – 1477,56	1059,32 \pm 195,98
ABTS-PLASMA (μ mol/l)	3,12 – 9,59	6,30 \pm 15,60
DPPH-PLASMA (μ mol/100 ml)	110,53 – 607,21	242,54 \pm 101,22

Mediante la técnica de ABTS se obtuvo una capacidad antioxidante total en un intervalo entre 3,12 y 9,59 (con una media de 6,3) μ mol/L. Se comparan estos resultados con los obtenidos en otros estudios de población sana utilizando también esta misma técnica, como el realizado en USA por Cao, *et al.* cuyo valor medio fue de 1,3 μ mol/l para una población de 65 años de media de edad. Un estudio mucho más reciente en España fue el de Serviá, *et al.* donde los valores obtenidos fueron de 2,3 μ mol/l para personas de 42 a 58 años aún muy por debajo de los obtenidos en el presente estudio (Cao et al., 1998; Serviá et al., 2014). Por tanto, los valores que hemos obtenido de capacidad antioxidante total mediante el método ABTS en plasma materno fue muy superior al de otros estudios reportados (6,3 vs 2,3 μ mol/l) probablemente porque la muestra era de menor edad (media de 30 años), mostrando con ello que la edad es un factor importante en la capacidad antioxidante total sérica.

Respecto a los resultados obtenidos mediante la técnica FRAP en plasma materno, se obtuvo una capacidad total antioxidante en rango de 695,22 – 1477,56 con una media de 1059,32 mmol/l. Al compararla con estudios que hayan utilizado la misma técnica, como el de Fernández-Pachón *et al.* (2005) que señalan un valor medio de 398 mmol/l vemos que los valores de nuestra muestra siguen siendo más elevados. En este caso no lo podríamos atribuir a la edad puesto que en este estudio el rango de edad fue de 25 a 35 años, por tanto muy similar al de nuestra muestra. Así se puede postular que

independientemente del método de análisis utilizado, la capacidad antioxidante total de nuestra muestra ha sido muy superior al de los reportados en la bibliografía, tal vez influenciado por el hecho de tratarse de madres gestantes (Fernández-Pachón et al., 2005).

Hay muy pocos estudios que evalúan la capacidad antioxidante en plasma de mujeres gestantes. Por un lado destacamos el realizado en Reino Unido (Toescu et al., 2004) en el que se comparaban los cambios en los niveles de los lípidos plasmáticos así como de los marcadores de estrés oxidativo comparando madres gestantes sanas (n=17) con madres con diabetes pregestacional (n=19) o diabetes gestacional (n=12). Se apreció el incremento del colesterol total y triglicéridos de forma significativa en todos los grupos, sin existir diferencias significativas intergrupales. Hubo evidencia de un incremento del estrés oxidativo entre las gestantes con diabetes respecto a las sanas. Y la capacidad antioxidante total a nivel plasmático era significativamente inferior en todas las diabéticas en relación al grupo control siendo los marcadores de estrés oxidativo (MDA) más elevados en el grupo de diabetes comparado con el no diabético.

Por otro lado, el más reciente referido en la bibliografía es el llevado a cabo en 2006 por Sharma *et al.* donde analizaron en 50 gestantes 3 marcadores de estrés oxidativo (malondialdehído, GPx, SOD) junto con dos antioxidantes (vitamina C y licopenos) en gestantes con preeclampsia y lo compararon con gestantes sanas a modo de grupo control. Concluyeron que los niveles de los 3 marcadores de estrés oxidativo están más elevados de una forma significativa en el grupo de la preeclampsia respecto al grupo control. Y los niveles de vitamina C y licopenos fueron menores en las gestantes con preeclampsia en relación al grupo control. De ello dedujeron que los marcadores de estrés oxidativo juegan un papel fundamental en la fisiopatología de la preeclampsia y la suplementación dietética con antioxidantes podría tener un papel beneficioso en la prevención de la preeclampsia en mujeres de alto riesgo (Sharma et al., 2006).

Por tanto hay muy pocos estudios en la bibliografía en los que se analiza la capacidad antioxidante plasmática en mujeres gestantes y mucho menos con un gran número de tamaño muestral como es el presente estudio, de ahí su trascendencia.

4.2 CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES EN PLASMA MATERNO

Los antioxidantes como se comentó previamente los podemos clasificar en endógenos y exógenos. Dentro de éstos últimos destacan los polifenoles y vitaminas como la A, E (tocoferoles) y C, entre otros. Se denominan antioxidantes exógenos dado que no pueden ser sintetizados por el organismo sino que necesitan ser aportados a través de la alimentación (Lobo et al., 2010).

Los polifenoles son derivados benzo-piranos y se dividen por clases según su grado de oxidación (Román, 2007). Entre ellos destacan los flavonoides por ser los de mayor capacidad antioxidante. Su estructura química se compone de varios anillos que se encuentran unidos por dobles enlaces y gracias a ello pueden captar radicales libres con facilidad, desactivarlos o impedir su formación. Asimismo, son capaces de quelar el hierro y el cobre, favorecer la acción de enzimas antioxidantes como la catalasa e inhibir enzimas pro-oxidantes como la mieloperoxidasa entre otras. (Varga et al., 2004). La acción combinada de los polifenoles potencia la capacidad antioxidante mediante la acción combinada de varios de ellos (Valls-Bellés et al., 2004). De hecho múltiples estudios han confirmado la relación entre la ingesta de alimentos ricos en polifenoles como por ejemplo el chocolate o el té, entre otros, con la disminución de las enfermedades cardiovasculares (Vita et al., 2005; Valls-Belles et al., 2005) y cáncer de colon (Martínez-Flores et al., 2002).

Por otro lado, los tocoferoles tienen como acción fundamental estabilizar las membranas celulares, prevenir la peroxidación lipídica y barrer los radicales peroxilo. Dentro de éstos, destaca α -tocoferol que es la única forma de vitamina E mantenida activamente en el cuerpo humano y es la que se encuentra en las cantidades más grandes en sangre y tejidos. Por tanto, su principal función es la de antioxidante. Las grasas, que son una parte integral de todas las membranas celulares, son vulnerables a la destrucción por oxidación a través de radicales libres (Traber, 2008). La vitamina liposoluble, α -tocoferol, es excepcionalmente apropiada para interceptar radicales libres y así prevenir un reacción en cadena de destrucción lipídica. Además de mantener la integridad de las membranas celulares en todo el cuerpo, también protege de la oxidación a las grasas en las lipoproteínas de baja densidad

(LDLs) que a su vez han sido involucradas en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. Cuando una molécula de α -tocoferol neutraliza un radical libre, se altera de tal forma que su capacidad antioxidante se pierde. Sin embargo, otros antioxidantes, como la vitamina C, son capaces de regenerar la capacidad antioxidante de α -tocoferol (Bruno et al., 2006).

Además de su importante función antioxidante, se han descrito otras funciones como la inhibición de la actividad de la proteína quinasa C, inhibición de la agregación de plaquetas y el aumento de la vasodilatación (Traber, 2008).

En la tabla 5 se muestran los niveles plasmáticos maternos de los antioxidantes analizados en el presente estudio.

TABLA 5: ANTIOXIDANTES EN PLASMA

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA \pm DS
POLIFENOLES-PLASMA ($\mu\text{g/ml}$)	10,91 – 133,32	101,5 \pm 25,52
α -TOCOFEROL-PLASMA (UI)	5,52 – 64,55	39,11 \pm 15,36

4.3 EVALUACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO EN LA MADRE

El estrés oxidativo es el daño oxidativo que resulta del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno y la defensa antioxidante y da lugar a una variedad de cambios fisiológicos y bioquímicos, los cuales provocan el deterioro y muerte celular (Hajjar et al., 2013).

Este tipo de daño puede medirse mediante métodos directos e indirectos. Entre los primeros tenemos la medición de la concentración de agentes oxidantes, que es muy difícil por su corta vida media y lo costoso que resultan los equipos, lo que hace necesario medirlos indirectamente mediante la determinación de productos terminales de la acción oxidante sobre biomoléculas (Rodríguez, 2015).

Daño oxidativo a moléculas biológicas:

Los radicales libres poseen una gran capacidad de reacción con moléculas de todo tipo, ya sean radicales o no, lo que justifica su implicación en una gran variedad de procesos tanto fisiológicos como patológicos. Los radicales libres pueden provocar daño oxidativo celular lo que daría lugar a especies reactivas capaces de continuar la acción oxidativa.

a) Daño oxidativo a lípidos. La lipoperoxidación, también conocida como enranciamiento oxidativo, es el proceso en el que se produce el mayor daño oxidativo en los lípidos. Representa una forma de daño celular que puede afectar a estructuras ricas en ácidos grasos poliinsaturado como por ejemplo las membranas celulares. Este proceso juega un importante papel en el envejecimiento de las células aeróbicas, siendo un proceso continuo y fisiológico actuando como renovador de las membranas biológicas, si bien es cierto que su activación excesiva se ha relacionado con la patogenia de patologías como la diabetes o la fibrosis pulmonar, entre otros.

Se distinguen 3 fases dentro de la lipoperoxidación: iniciación, producida cuando cualquier especie reactiva ataca un átomo de hidrógeno del doble enlace de un grupo metileno generando así un radical lipídico; propagación, el radical lipídico tiende a estabilizarse por reordenación molecular y en condiciones aeróbicas reaccionan con el oxígeno formando radicales peroxilo; y la terminación, última fase cuando dos hidroperóxidos reaccionan entre sí dando un tetróxido o cuando son neutralizados por antioxidantes. Los tetróxidos son inestables y al romperse generan aldehídos como el malondialdehído (MDA).

La lipoperoxidación constituye el “patrón oro” cuando se trata de probar la función de los radicales libres en algún tipo de daño celular, existiendo diversas formas de medirla y suele llevarse a cabo a través de sus productos finales mediante la medición de compuestos que reaccionan con el ácido tiobarbitúrico. Está basado en la reacción de este ácido con el MDA, producto este del desdoblamiento de los hidroperóxidos, formándose durante las últimas etapas de la ruptura de endoperóxidos durante la reestructuración molecular de los ácidos

grasos. A nivel celular puede ser metabolizado por ejemplo por la aldehído deshidrogenasa hepática. La determinación de MDA tiene lugar mediante una prueba colorimétrica, formándose así un color susceptible de ser medido directamente. Su análisis es usado por su buena practicabilidad y sencillez. Por tanto, el contenido de MDA en líquidos biológicos maternos refleja bien el daño oxidativo lipídico materno (Esterbauer et al., 2001).

b) Daño oxidativo a proteínas. Todos los aminoácidos presentes en las proteínas tienen residuos susceptibles de ser atacados por los radicales libres, sobre todo por el radical hidroxilo. Tendrá lugar el daño oxidativo sobre un grupo de aminoácidos como la fenilalanina, triptófano o metionina, entre otros. Asimismo se formarán entrecruzamientos de cadenas peptídicas, se fragmentará la proteína a través de la ruptura de enlaces peptídicos y finalmente tendrá lugar la formación de grupos carbonilo (GC), que impedirán el desarrollo normal de sus funciones. El sistema de oxidación catalizada por metales es el mecanismo más importante dentro de la modificación oxidativa de las proteínas.

El ataque de los radicales libres a las proteínas podrá ser difuso, dando lugar a modificaciones generalizadas, o selectivos, dando modificaciones en sitios específicos. La introducción de grupos carbonilo en las proteínas es un ejemplo de modificación oxidativa global de las proteínas, que suele provocar habitualmente la pérdida de función estructural o catalítica de las proteínas afectadas. Por otro lado, en los ataques selectivos se crea un daño oxidativo en el que los metales de transición juegan un papel fundamental siendo los enzimas que contienen dichos metales los más susceptibles de sufrir dicho daño.

Habitualmente las células se encargan de eliminar aquellas proteínas que han sido modificadas desde el punto de vista oxidativo y lo hacen mediante proteólisis. Pero dado que algunas proteínas oxidadas pueden ser más resistentes a su eliminación y por el posible aumento de su tasa de formación, se produciría así un acúmulo de proteínas oxidadas con los efectos perjudiciales que ello conllevaría. (Levine, 2012).

De esta forma, la evaluación en nuestro estudio del daño oxidativo a las proteínas se ha llevado a cabo mediante la cuantificación de los grupos carbonilo en plasma y orina maternos.

c) Daño oxidativo al ADN. Debido a las interacciones con los radicales libres pueden producirse alteraciones en el ADN y ello está implicado en la patogenia de diversas patologías así como en el envejecimiento. En ambas situaciones hay un elevado estrés oxidativo y ello podrá desencadenar un gran número de mutaciones, pérdida parcial o total de cromosomas, etc. El radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno son los principales agentes implicados. Hay que tener en cuenta que aunque hay más de 12 metabolitos producidos durante el ataque radicalico al ADN, sólo algunos de ellos han podido ser utilizados como marcadores de dicho ataque. Dentro de las alteraciones más frecuentes en las bases púricas destaca la formación de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina (8OHdG) con un elevado efecto mutagénico. Y respecto a las bases pirimidínicas se hallan los glicoles de timina y citosina.

El ADN mitocondrial presenta una mayor tasa de mutación por modificaciones oxidativas de sus bases. La 8OHdG es 16 veces superior a la encontrada en el ADN nuclear lo que podría traducirse en una disfunción mitocondrial y dar lugar al desarrollo del fenotipo característico de la senescencia celular. Este último también ha sido analizado en nuestro estudio. Su importancia radica en que su cuantificación permite estudiar la variación del daño oxidativo al ADN. (Roche y Romero, 2006).

En el presente estudio se realizó la evaluación del daño oxidativo tanto en plasma (tabla 6) como en orina materna (tabla 7) para analizar si había relación con el estado oxidativo de la leche materna y en consecuencias con el estado del recién nacido.

Así pues se realizó la medición en plasma y orina maternos de los grupos carbonilo como marcador del daño oxidativo a proteínas, del MDA como marcador de

daño oxidativo a lípidos y la 8OHdG como marcador de daño al ADN. (Shohi et al., 2004).

TABLA 6: DAÑO OXIDATIVO MATERNO – EVALUACIÓN EN PLASMA

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA \pm DS
MDA-PLASMA (nmol/ml)	0,35 - 2,51	1,39 \pm 0,46
GC-PLASMA (nmol/mg proteína)	0,36 - 5,10	1,82 \pm 1,31
8OHdG-PLASMA (ng/ml)	0,27 - 20,45	3,95 \pm 3,70

TABLA 7: DAÑO OXIDATIVO MATERNO – EVALUACIÓN EN ORINA

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA \pm DS
MDA-ORINA (nmol/ml)	0,116 – 2,748	0,851 \pm 0,602
GC-ORINA (nmol/mg proteína)	0,004 – 0,174	0,055 \pm 0,039
8OHdG-ORINA (ng/ml)	9,64 – 64,45	23,042 \pm 10,401

MDA = malonildialdehido
 8OHdG = 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina
 GC = grupos carbonilo

Como se ha comentado previamente, el estrés oxidativo se refiere a un estado de las células en el que hay desequilibrio entre la oxidación y la reducción celulares, es decir, entre las sustancias oxidantes y antioxidantes que se generan por excesiva producción de especies reactivas de oxígeno y/o por deficiencia en los mecanismos antioxidantes, lo que lleva a daño celular. Los radicales libres interactúan con macromoléculas produciendo una reacción conocida como peroxidación lipídica y de esta interacción macromolécula-radical se producen metabolitos como el MDA, que se puede detectar en muestras biológicas; un aumento de este metabolito implica indirectamente un mayor estrés oxidativo. En nuestro caso se ha estudiado a nivel urinario la eliminación de MDA, grupos carbonilo y 8OHdG.

No se ha encontrado en la bibliografía estudios que analicen los marcadores de daño oxidativo a nivel urinario en madres gestantes, de ahí la gran importancia de nuestro estudio por ser pionero en ello.

El GC es una buena técnica, ampliamente utilizada como marcador de daño oxidativo en plasma. Varios estudios muestran que los recién nacidos de bajo peso así como los grandes para la edad gestacional tienen niveles más altos de GC en orina que los nacidos con peso adecuado para su edad gestacional (Saker, 2008). Incluso también se ha estudiado los niveles de GC en plasma, siendo más elevados en los niños prematuros (Friel et al., 2011)

Los niveles de MDA también son considerados como buenos marcadores de daño oxidativo. Y en el caso de recién nacidos pretérmino también se ha visto que sean más altos si se comparan con los presentes en los a término. (Valls-Bellés et al., 2008)

Los niveles de 8OHdG plasmáticos pero sobre todo su excreción urinaria son considerados como un buen marcador de daño oxidativo sufrido por el ADN, debido a su elevada sensibilidad. Varios estudios lo consideran como buen indicador de enfermedades causadas por radicales libres en los neonatos de muy bajo peso al nacimiento y para medir los efectos de la suplementación con antioxidantes (Shohi et al., 2003) aunque otros autores (Ledo et al., 2009) sólo lo consideran útil como marcador de lo primero.

4.4 CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA

La capacidad antioxidante total de la leche humana es una medida de la capacidad de la leche materna para controlar el desequilibrio oxidación-reducción. Esta medición se ha descrito como un indicador sensible puesto que es capaz de detectar pequeñas diferencias de forma más óptima que si se realizaran las mediciones de los antioxidantes por separado (Castillo-Castañeda et al., 2016).

Se realizó la medición de la capacidad antioxidante total de la leche materna mediante tres métodos diferentes: FRAP, ABTS y DPPH (tabla 8).

En el presente estudio se han utilizado 3 métodos diferentes para medir la capacidad antioxidante total de la leche materna. Cada método mide la capacidad antioxidante de compuestos bioactivos diferentes con capacidades antioxidantes variables y con acciones sinérgicas en algunos casos (unos miden la capacidad para

detener algún tipo de fuente de inicio de oxidación, otros miden la capacidad de donar electrones a un determinado radical libre y otros la quelación de un metal de transición). De esta forma, los resultados obtenidos en la misma muestra a través de la utilización para su análisis de diferentes métodos suelen ser diferentes ya que determinan acciones antioxidantes diversas.

TABLA 8: CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE MATERNA MEDIANTE 3 MÉTODOS DIFERENTES

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA \pm DS
FRAP-LECHE (mmol/l)	0,67 – 6,07	3,47 \pm 1,11
ABTS-LECHE (μ mol/l)	625,9 – 2803,7	1817,28 \pm 510,68
DPPH-LECHE (μ mol/100 ml)	7,29 - 56,97	29,62 \pm 10,14

Era esperable que se obtuvieran diferentes resultados obtenidos a partir de métodos distintos puesto que en la leche coexisten múltiples sustancias antioxidantes con capacidad para interactuar entre sí (Friel et al., 2011), coincidiendo así con lo descrito previamente por otros autores (Janaszewska y Bartosz, 2002).

De hecho ya está recogida en la bibliografía la ausencia de correlación entre los valores medidos de capacidad antioxidante por dos métodos diferentes como el ABTS y DPPH, y sugieren que a pesar de que ambos métodos puedan medir la capacidad reductora de un líquido corporal, cada uno de ellos mediría el contenido de distintos compuestos. El FRAP por su parte mide fundamentalmente la actividad antioxidante de compuestos como el ácido ascórbico y el alfa tocoferol entre otros aunque no el de proteínas, glutatión o ácido lipóico (Martysiak-Zurowska y Wenta, 2012).

Teniendo en cuenta estas premisas se decidió utilizar 3 métodos diferentes de medición de la capacidad antioxidante total de la leche materna puesto que al medir diferentes componentes así como las interacciones entre ellos es una herramienta útil no sólo porque nos permite valorar dicha capacidad sino porque nos permite evaluarla de una manera óptima.

La capacidad antioxidante total de la leche humana analizada en nuestro estudio, como era de esperar según estas premisas, presentó una amplia variabilidad independientemente del método de análisis utilizado.

- a) En el caso del FRAP presentó un valor mínimo de 0,67 y un máximo de 6,07 con una media de 3,47 mmol/l.
- b) Con el método ABTS el valor mínimo fue de 625,9 y el máximo de 2803,7 y su media fue de 1817,28 $\mu\text{mol/l}$.
- c) Por último, el análisis mostrado a través del método DPPH obtuvo unos valores mínimos de 7,29 y máximos de 56,97 con una media de 29,62 $\mu\text{mol/100 ml}$.

Por tanto, como puede apreciarse en la tabla 8, la capacidad antioxidante total de la leche materna muestra una gran variabilidad, lo que coincide con lo publicado en la bibliografía (Miranda et al., 2011).

La ingesta de agentes ricos en antioxidantes a través de la leche puede constituir un problema significativo para el equilibrio oxidativo de los neonatos debido a la inmadurez de sus mecanismos de defensa antioxidantes, que pueden ser superados por la excesiva presencia de especies reactivas de oxígeno (ROS), especialmente en los recién nacidos pretérmino.

Si comparamos los datos de capacidad antioxidante de la leche materna de nuestro estudio (calostro) fue superior al encontrado en la bibliografía. Destaca por ejemplo que con el método FRAP que fue de 3,47 mmol/l de media con el obtenido en la población iraní en el estudio realizado por Zarban cuya media fue de 1,06 mmol/l se aprecia que en nuestra población estudiada es mucho mayor, unas tres veces superior respecto a la publicada (Zarban et al., 2009).

Se puede deducir por tanto que la capacidad antioxidante de las mujeres de nuestro estudio fue superior a la publicada en la bibliografía, probablemente influenciado por el tipo de alimentación puesto que la dieta mediterránea es más rica en antioxidantes por el mayor consumo de verduras, hortalizas y aceite de oliva, entre otros.

De estos resultados además puede concluirse que la leche humana contiene antioxidantes y su capacidad antioxidante total no sólo se debe a la concentración de antioxidantes sino a las interacciones entre ellos.

No hay que olvidar que la leche es un líquido biológico dinámico en continua producción y su composición se va adaptando en todo momento a las necesidades del lactante.

Hay otros métodos para poder cuantificar la capacidad antioxidante total de la leche materna como el ABTS. La solución base se preparó disolviendo 38,4 mg de 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido) (ABTS) en 10 cm³ de una solución de persulfato de sodio y la mezcla se mantuvo en ambiente oscura durante 12 horas. Las muestras de leche humana se hicieron reaccionar con 1 cm³ de la ABTS durante 10 minutos. La capacidad antioxidante de las muestras de leche humana se expresó en miligramos del Trolox Equivalente TE por 100 cm³ (Bjorck et al., 1993).

Otro de ellos es el DPPH, en el que la solución madre se preparó disolviendo 10 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) en 10 cm³ de metanol. Las muestras de leche humana se hicieron reaccionar con 1 cm³ de la solución de trabajo DPPH y 0,5 cm³ de cloroformo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar se mide la absorbancia a 515 nm frente a la muestra de referencia. Los resultados serán expresados en mg TE en 100 cm³ de leche humana ((Martysiak-Zurowska y Wenta, 2012).

Al contrario de lo ocurrido con el método FRAP, hay escasa bibliografía en lo que se refiere al análisis de la capacidad antioxidante total de la leche materna a través de los métodos DPPH y ABTS, y los existentes se basan en una muy pequeña muestra.

La siguiente figura (figura 5) representa que no existe una correlación lineal entre los valores de CAT de muestras de leche humana obtenidas por ambos métodos (correlación de Pearson de 0.18), que se realizó en 69 muestras.

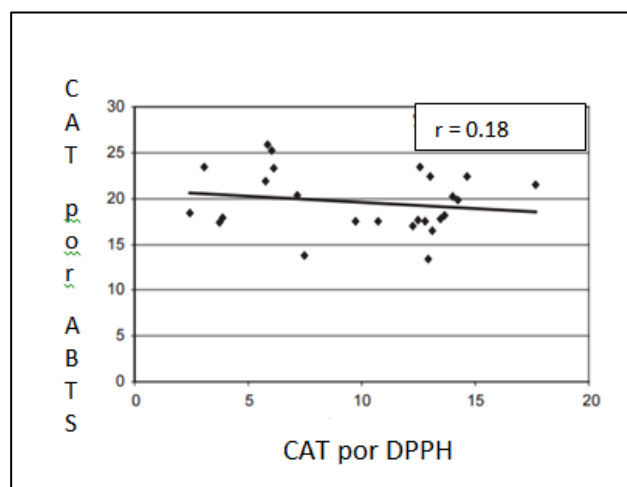


Fig 5: Correlación entre CAT leche humana medida por ABTS vs DPPH.

Uno de los últimos estudios publicados fue el Martysiak-Zurowska y Wenta. de 2012. En él se realiza la comparación de ambos métodos para la analizar la CAT de la leche obtenida de 25 madres en su 14^a día postparto. Los valores medios de CAT obtenidos en dicho estudio a través del método DPPH (25,23 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$) son muy similares respecto a los obtenidos en nuestro estudio (29,62 $\mu\text{mol}/100\text{ ml}$) con la diferencia que en nuestro estudio se analizó el calostro y en dicho estudio fue la leche de transición. Y al comparar nuestros resultados de CAT medida con ABTS (media de 1817.28 $\mu\text{mol}/\text{l}$) con otros estudios destaca que nuestros valores fueron superiores a los publicados para mujeres portuguesas (399 $\mu\text{mol}/\text{l}$) (Matos, 2009) o polacas (381,84 $\mu\text{mol}/\text{l}$) (Martysiak-Zurowska y Wenta, 2012) y más similares a los publicados por los italianos (2818 $\mu\text{mol}/\text{l}$) (Turoli et al., 2004) probablemente influenciado por la similitud de la alimentación de nuestras poblaciones.

Por tanto nuestro trabajo destaca por ser el único en el que se ha analizado mediante tres métodos diferentes la capacidad antioxidante total de la leche materna en un mismo estudio, lo que le confiere gran importancia.

4.5 CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES EN LECHE MATERNA

Recordemos que los antioxidantes son aquellos compuestos capaces de aceptar o donar un electrón a los radicales libres mientras conservan su estabilidad; por ello no se

transforma en una molécula reactiva al perder dicho electrón, lo que les otorga la capacidad de frenar la cadena de oxidación. Pueden realizarse diferentes clasificaciones teniendo en cuenta criterios de selección diferentes, y en base a su origen hablaremos de exógenos (aquellos que no pueden ser sintetizados por el organismo y necesitan ser aportados por medio de la alimentación, entre ellos los polifenoles) y endógenos (entre los que destaca la coenzima Q10).

Los polifenoles son derivados benzo- γ -piranos y se subdividen en clases según su grado de oxidación. Dentro de éstos, los que poseen mayor capacidad antioxidante son los flavonoides, existiendo más de 5000 distintos (Beecher, 2003). Su estructura química, con varios anillos unidos por dobles enlaces les permite con facilidad captar radicales libres, desactivarlos o impedir su formación de modo directo o indirecto. Son capaces de quelar el hierro y el cobre, favorecer la acción de enzimas antioxidantes (como la catalasa) e inhibir enzimas prooxidantes como la ciclooxigenasa, mieloperoxidasa o fosfolipasa A2 (Varga et al., 2004). La acción combinada de los polifenoles potencia la capacidad antioxidante mediante la acción combinada de varios de ellos. La ingesta de té, chocolate y otros alimentos ricos en polifenoles se ha relacionado con una disminución de enfermedades cardiovasculares y cáncer de colon. En el colon podrían actuar como secuestradores de diversos radicales libres (Halliwell y Whiteman, 2012).

La Coenzima Q10 (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4benzoquinona) o ubiquinona es un compuesto lipídico esencial que actúa como antioxidante intracelular protegiendo a los fosfolípidos de membrana, proteínas de membrana mitocondrial y lipoproteínas de baja densidad frente al daño oxidativo inducido por los radicales libres. Es considerada como un elemento esencial en la cadena respiratoria mitocondrial para la síntesis de ATP. Es un potente antioxidante que actúa en la prevención del daño oxidativo del ADN, de las lipoproteínas y de los lípidos de la membrana celular. Es sintetizada como producto terminal en la vía del mevalonato aunque también es obtenida por el organismo a través de la dieta. Destaca por ser considerado el antioxidante lipofílico de síntesis endógena más importante, además su potencia antioxidante es muy superior a la de otros (Bentinger et al., 2007).

En la siguiente tabla se muestra el contenido de antioxidantes de la leche materna de nuestro estudio (tabla 9).

TABLA 9: ANTIOXIDANTES CONTENIDOS EN LECHE MATERNA

	INTERVALO (MÍN-MÁX)	MEDIA \pm DS
POLIFENOLES-LECHE ($\mu\text{g/ml}$)	0,92 – 1,99	1,23 \pm 0,24
COENZIMA Q10-LECHE ($\mu\text{mol/l}$)	1,66 – 12,23	6,46 \pm 2,43

Las funciones de los polifenoles son variadas y de suma importancia tales como su acción antioxidante, antiinflamatoria, antiagregación plaquetaria e inmunológica, entre otras (Dueñas et al., 2015). Y dado que durante las primeras etapas de la vida es la leche la única fuente de polifenoles, por ello es de suma importancia su cuantificación. (Landete, 2012).

Hay muy pocos estudios hoy en día que analicen la los polifenoles en la leche humana y los que hay han utilizado pequeño tamaño muestral por lo que sus conclusiones podrían no ser representativas.

Destaca el estudio de Franke *et al.* de 2006 en el que compara la cantidad ingerida de éstos por parte de la madre, su presencia en la leche materna e incluso su eliminación a través de la orina del bebé (Franke et al., 2006).

Otro estudio posterior (Song, 2013) analizó el contenido de distintos flavonoides en la leche materna de 17 mujeres pero no estudiaron el contenido total de polifenoles. El más reciente de ellos data en 2015 (Vázquez et al., 2015) también de tamaño muestral escaso, tan sólo 10 madres mejicanas pero su objetivo era validar un nuevo método de extracción de leche no así de su contenido propiamente dicho.

Por tanto, a pesar del aumento progresivo del interés sobre el análisis de los polifenoles en la dieta, hay escasez en cuanto al estudio de su contenido en la leche humana, de ahí la importancia y lo pionero de nuestro estudio. Hay que destacar además que los estudios publicados previamente son con tamaños muestrales minúsculos, el mayor fue 17 participantes, frente a las 90 de nuestro estudio lo que aumenta su valor y representatividad de sus resultados.

Lo que ocurre en relación a la Coenzima Q10 es similar puesto que también hay pocos estudios que analizan su contenido en la leche humana. Uno de los primeros estudios publicados donde se analizan el contenido de este coenzima en la leche humana data de 2006 (Quiles et al., 2006) realizado también sobre población española. Los resultados obtenidos en calostro en niños a término ($6,97 \pm 0,53 \mu\text{mol/l}$) fue muy similar al obtenido en nuestro estudio ($6,46 \pm 2,43 \mu\text{mol/l}$). No se han encontrado en la literatura estudios similares posteriores para poder obtener resultados adicionales al respecto.

En general, el contenido de Coenzima Q10 en la leche se ha visto que es más elevado en el calostro y va disminuyendo a medida que la leche va madurando. Se cree que ello podría deberse a las necesidades elevadas del neonato tras el nacimiento y la disminución posterior podría deberse al gasto de las reservas maternas (Jing et al., 2011).

Esta coenzima se puede sintetizar endógenamente, aunque también puede ser suplementada farmacológicamente o a través de la dieta. Es considerado como el antioxidante lipofílico más importante porque protege de la oxidación al ADN afectando así la expresión génica.

Se ha publicado recientemente un estudio (Jing et al., 2015) diseñado para analizar si la coenzima Q10 a través de su suplementación farmacológica era capaz de proteger a los astrocitos de las especies reactivas de oxígeno. Concluyeron que la Coenzima Q10 puede proteger a los astrocitos a través de la supresión del estrés oxidativo, prevención de la disfunción mitocondrial, bloqueo de vía de muerte celular mediada por la mitocondria y potenciación de la biogénesis mitocondrial.

Los niveles de Coenzima Q10 en la leche materna han sido relacionados por diferentes autores (Quiles et al., 2006; Li, 2009) de una forma directamente proporcional no solo con la capacidad antioxidante total de la leche humana sino que también se ha relacionado su suplementación exógena con mejoría en la respuesta inmune. (Bentinger et al., 2007). De ahí la gran importancia que tiene el poder mantener o incluso incrementar los niveles adecuado de coenzima Q10 durante el periodo neonatal por su influencia en las diferentes etapas posteriores de la vida.

5. ESTADO OXIDATIVO (II): RELACIÓN CON DIFERENTES FACTORES

5.1 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA CON LOS DATOS ANTROPROMÉTRICOS DE MADRE E HIJO

Por un lado, se realizó el análisis comparativo de los diferentes datos antropométricos de la madre recogidos en el estudio para tratar de averiguar si había algún tipo de relación entre éstos y la CAT de la leche materna (tabla 10).

TABLA 10: RELACIÓN ANTROPOMETRÍA MATERNA Y CAT LECHE

	Coefficiente correlación	PESO INICIO	PESO FINAL	IMC INICIO	IMC PARTO
FRAP-LECHE	r	-0,074	-0,079	-0,098	-0,116
	p	0,615	0,587	0,503	0,426
ABTS-LECHE	r	-0,09	-0,092	-0,238	-0,25
	p	0,551	0,542	0,111	0,094
DPPH-LECHE	r	-0,207	-0,218	-0,089	-0,111
	p	0,212	0,189	0,593	0,509

No se ha obtenido ningún dato estadísticamente significativo de la relación de la capacidad antioxidante de la leche materna con el incremento de peso durante la gestación o del índice de masa corporal de la madre ni previo a la gestación ni al finalizar ésta.

TABLA 11: RELACIÓN CAT LECHE Y OTROS DATOS

	Coefficiente correlación	EDAD MADRE	EG	PESO RN
FRAP-LECHE	r	0,08	-0,041	-0,361
	p	0,586	0,782	0,011
ABTS-LECHE	r	0,04	-0,118	-0,163
	p	0,79	0,435	0,278
DPPH-LECHE	r	-0,257	0,219	-0,025
	p	0,12	0,186	0,881

Por otro lado, se analizaron también otras variables como fueron la edad de la madre en el momento del parto, edad gestacional y el peso del recién nacido (tabla 11).

No hemos encontrado significación estadística al relacionar la capacidad antioxidante de la leche materna con la edad de la madre o con la edad gestacional.

Sin embargo, sí que se han obtenido al relacionarla con el peso al nacimiento del recién nacido. Los datos obtenidos en 74 recién nacidos se muestran en la figura 6.

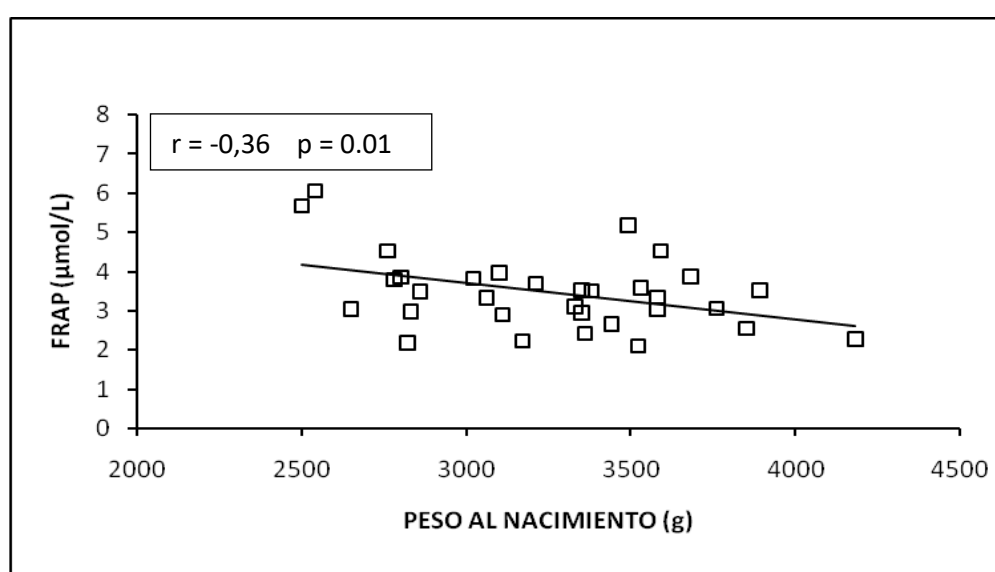


Fig.6. Correlación entre CAT leche humana (FRAP) con peso al nacimiento del RN.

Así se ha visto que a menor peso al nacer del recién nacido, mayor es la capacidad antioxidante de la leche materna medida con el método FRAP. Esto es algo a destacar ya que puede indicar la adaptación biológica tan importante que se produce en el caso de los recién nacidos de menor peso al nacer. Dado que cuanto menor es el peso al nacer, menor es la capacidad de combatir el estrés oxidativo y por tanto mayor riesgo de desequilibrio, es en esos casos donde aumenta todavía más la capacidad antioxidante de la leche materna para tratar de compensar dicha situación.

5.2 RELACIÓN CAPACIDAD ANTIOXIDANTE LECHE MATERNA CON PARÁMETROS BIOQUÍMICOS DEL PLASMA MATERNO

Se ha realizado el análisis de la correlación entre los parámetros bioquímicos de plasma materno con la capacidad antioxidante total de la leche materna.

TABLA 12: RELACIÓN CAT LECHE Y BIOQUÍMICA MATERNA (I)

MÉTODO	Coefficiente correlación	GLUCOSA	UREA	CREATIN.	ÁC.ÚRICO	GOT	GPT	GGT
FRAP-LECHE	r	0,177	0,044	0,051	0,041	-0,183	0,018	-0,034
	p	0,223	0,763	0,726	0,778	0,209	0,902	0,815
ABTS-LECHE	r	-0,019	-0,001	0,387	-0,156	-0,253	-0,1	0,068
	p	0,902	0,993	0,008	0,299	0,089	0,507	0,652
DPPH-LECHE	r	-0,156	-0,401	-0,119	0,079	0,112	0,315	0,227
	p	0,348	0,013	0,477	0,635	0,502	0,054	0,17

Creat.: creatinina

Ác. Úrico: ácido úrico

GOT: Transaminasa glutámico oxalacética

GPT: Transaminasa glutámico pirúvica

GGT: Gamma glutamil transpeptidasa

Destacamos a continuación aquellos cuyos resultados han presentado significación estadística al presentar una “p” menor de 0,05.

- 1) Relación entre niveles de urea sanguínea materna y la capacidad antioxidante de la leche materna analizada mediante el método DPPH (tabla 12). Al obtenerse un grado de correlación negativa se puede interpretar que la capacidad antioxidante de la leche materna medida mediante DPPH aumenta a medida que los niveles de urea plasmática materna disminuyen. No se ha encontrado en la bibliografía estudios que hayan recogido esta correlación.
- 2) Relación entre los niveles de creatinina sanguínea materna y la capacidad antioxidante de la leche materna analizada mediante el método ABTS (tabla 12). En este caso al tratarse de una correlación positiva indica que la capacidad antioxidante de la leche medida mediante ABTS aumentará

a medida que los niveles de creatinina maternos también lo hagan. Tampoco se han encontrado estudios que muestren con anterioridad esta relación.

Por tanto cabe destacar en este caso que la capacidad antioxidante total de la leche parece estar relacionados con la función renal materna.

TABLA 13: RELACIÓN CAT LECHE Y BIOQUÍMICA MATERNA (II)

MÉTODO	Coefficiente correlación	COLESTEROL	HDL-c	LDL-c	VLDL-c	TG
FRAP- LECHE	r	0,131	0,046	0,101	-0,067	-0,019
	p	0,371	0,755	0,492	0,649	0,895
ABTS- LECHE	r	0,044	0,248	0,013	-0,318	-0,277
	p	0,769	0,096	0,93	0,031	0,062
DPPH- LECHE	r	0,206	0,049	0,134	0,191	0,236
	p	0,215	0,769	0,421	0,252	0,154

HDL-c: Lipoproteína de alta densidad

LDL-c: Lipoproteína de baja densidad

VLDL-c: Lipoproteína de muy baja densidad

TG: Triglicéridos

- 3) Respecto al perfil lipídico materno (tabla 13), destaca la correlación negativa entre los niveles de VLDL maternos con la capacidad antioxidante de la leche medida mediante el método ABTS. Dicho de otra forma, a mayor nivel de VLDL materno, menor capacidad antioxidante de la leche medida mediante ABTS.

TABLA 14: RELACIÓN CAT LECHE Y BIOQUÍMICA MATERNA (III)

MÉTODO	Coefficiente correlación	PT	CALCIO	FÓSFORO	HIERRO	FA
FRAP- LECHE	r	-0,074	-0,024	0,099	0,306	0,096
	p	0,613	0,871	0,497	0,033	0,51
ABTS- LECHE	r	0,228	0,115	-0,067	0,300	-0,196
	p	0,127	0,445	0,66	0,042	0,193
DPPH- LECHE	r	-0,111	-0,354	0,155	0,350	0,212
	p	0,509	0,029	0,354	0,031	0,201

PT: Proteínas totales

FA: Fosfatasa alcalinas

- 4) Los niveles de calcio en plasma materno (tabla 14) tiene una correlación negativa con la capacidad antioxidante de leche medida con el método DPPH por lo que a mayores niveles de calcio maternos, menor será la capacidad antioxidante de su leche o viceversa.

- 5) Sin duda, la correlación del hierro con la capacidad antioxidante de la leche materna es lo más destacable pues se han obtenido resultados estadísticamente significativos con los 3 métodos analizados, independientemente de cual se use (tabla 14). Ello nos indica la gran importancia que tiene el aporte de hierro por su relación con la capacidad antioxidante total de la leche materna. En los tres métodos además dicha correlación ha sido positiva, es decir, a mayores niveles de hierro en plasma materno, mayor será la capacidad antioxidante de su leche.

Por tanto, hay que hacer mención especial a los datos obtenidos en relación al hierro, pues es el único elemento de los analizados cuya relación con la capacidad antioxidante total de la leche ha sido significativa independientemente del método analizado.

Hay que recordar que el hierro, al igual que otros metales de transición como el cobre, el cromo o el mercurio, es capaz de hacer ciclos redox en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Esta acción cataliza reacciones que producen radicales y puede producir especies reactivas del oxígeno. La mayoría de las enzimas que producen las especies reactivas del oxígeno contienen uno de estos metales. Por tanto, como el hierro tiene la capacidad de ceder o donar electrones con facilidad, puede catalizar reacciones vía radicales libres e incrementar el estrés oxidativo. Así, la peroxidación lipídica y riesgo cardiovascular son consecuencias de la sobrecarga de hierro.

Recientemente, se ha descrito también una relación entre el metabolismo del hierro y la resistencia a la insulina y la obesidad. Por el contrario, aún existe gran

controversia en cuanto a la relación entre la anemia ferropénica y la enfermedad cardiovascular. (Toxqui et al., 2010).

En general, los metales de transición participan como catalizadores de los procesos oxidativos a nivel biológico y por ello su toxicidad puede estar relacionada en parte con el daño oxidativo celular y tisular. Estos metales tienen la capacidad de producir especies reactivas de oxígeno que intervienen en la peroxidación lipídica como se ha comentado anteriormente, daño en el ADN, depleción de proteínas con grupos sulfhidrilo, alteración en la homeostasis de calcio y toxicidad a nivel renal, hepático y neurológico. (Zago y Oteiza, 2001).

Algunos de los metales tienen una doble función en situaciones de estrés oxidativo: por un lado, participan como promotores en las reacciones de oxidación y, por otro lado, juegan un papel importante en la defensa antioxidante ya que forman parte de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa o la catalasa.

Mientras que el hierro forma parte de la estructura de la catalasa, el zinc y el cobre por su parte lo hacen de la superóxido dismutasa citosólica. El zinc además tiene actividad antioxidante per se a través de dos mecanismos de acción diferentes: previene la generación de especies reactivas de oxígeno mediante competencia por los sitios de unión con metales como cobre y hierro y a su vez protege los grupos sulfhidrilo de las proteínas de la oxidación.

La versatilidad del hierro y cobre en el metabolismo oxidativo les proporciona la capacidad de ejercer funciones antioxidantes o prooxidantes según la estructura de la que formen parte. Al tratarse de nutrientes esenciales para la especie humana, su déficit y también su exceso afectarán a su estado de salud, y ambas situaciones pueden controlarse a través de la alimentación. (Srigiridhar et al., 2001).

Diversos estudios han demostrado la capacidad del hierro en catalizar la formación de radicales libres y estimular como se ha comentado con anterioridad la peroxidación lipídica, donde desempeña un papel crucial ya sea en forma ferrosa o férrica. Este proceso también se verá favorecido cuando el hierro se encuentre unido a otros quelantes como la histidina, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o citratos. (Engelmann et al., 2003).

La actividad redox del complejo formado por EDTA y hierro puede deberse a que el ligando no sature por completo los lugares de coordinación del hierro, quedando así libres y pudiendo entonces ser ocupados por peróxido de hidrógeno u otros reductores celulares. El cobre actúa de una manera similar al hierro catalizando estos mismos procesos. Ambos actúan como agentes catalíticos promoviendo la formación del radical hidroxilo.

Además, los complejos de hierro son considerados como los agente iniciadores de la peroxidación lipídica que consiste en un daño oxidativo de ácidos grasos poliinsaturados que se produce mediante un proceso autocatalítico e incontrolable. (Nevado, 2000).

En condiciones fisiológicas, el hierro se encuentra asociado a una proteína ya que su presencia en forma aislada puede producir daños graves en los tejidos. Esta toxicidad se debe a la habilidad del hierro libre de generar especies reactivas de oxígeno. Dado que tanto la deficiencia como la sobrecarga de este metal esencial son perjudiciales, su absorción, concentración y estado redox deben ser regulados cuidadosamente. (Pérez et al., 2005)

A modo de resumen, la correlación existente entre la capacidad antioxidante de la leche humana y los niveles bioquímicos de plasma materno en nuestro estudio son:

- Directamente proporcionales en el caso de niveles de creatinina y hierro.
- Inversamente proporcionales en relación a urea, VLDL colesterol y calcio.

Dado que el hierro es un metal que interviene en la gran mayoría de los procesos oxidativos que tienen lugar en el organismo, es por ello, que independientemente del método de análisis utilizado (FRAP, ABTS o DPPH) se ha obtenido correlación con éste en todos ellos. Por tanto hay que remarcar que el hierro es el único parámetro de entre todos los analizados que está correlacionado de forma significativa con la capacidad antioxidante total de la leche materna y ese resultado se muestra con los 3 métodos de estudio diferente.

5.3 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA CON EL CONTENIDO DE MACRONUTRIENTES DE LA DIETA MATERNA

Cuando se analizan por separado y en valores absolutos los macronutrientes que forman parte de la dieta de las madres gestantes, no se ha encontrado ningún resultado estadísticamente significativo al relacionarlo con la capacidad antioxidante de la leche materna (tablas 15 y 16).

TABLA 15: RELACIÓN CAT LECHE Y MACRONUTRIENTES DIETA (I)

MÉTODO	Coefficiente correlación	KCAL	PROTEINAS	GLUCOSA	COLESTEROL	FIBRA
FRAP-LECHE	r	-0,074	-0,209	-0,053	-0,04	0,003
	p	0,615	0,15	0,715	0,787	0,981
ABTS-LECHE	r	-0,008	-0,184	-0,051	0,173	0,2
	p	0,956	0,222	0,735	0,251	0,182
DPPH-LECHE	r	0,042	0,014	-0,012	0,075	0,076
	p	0,801	0,932	0,943	0,655	0,649

TABLA 16: RELACIÓN CAT LECHE Y MACRONUTRIENTES DIETA (II)

MÉTODO	Coefficiente correlación	GRASAS	AGM	AGP	AGS
FRAP-LECHE	r	0,134	-0,172	0,225	-0,08
	p	0,357	0,238	0,12	0,585
ABTS-LECHE	r	0,078	-0,125	0,05	0,158
	p	0,607	0,408	0,742	0,294
DPPH-LECHE	r	0,046	-0,038	0,05	0,103
	p	0,783	0,821	0,767	0,54

AGM = Ácidos Grasos Monoinsaturados

AGP = Ácidos Grasos Poliinsaturados

AGS = Ácidos Grasos Saturados

Pero cuando se analiza el porcentaje que representa cada uno de los macronutrientes en relación al aporte calórico total diario, estos resultados cambian de manera importante (tabla 17).

TABLA 17: RELACIÓN CAT LECHE Y MACRONUTRIENTES DIETA (III)

MÉTODO	Coefficiente correlación	%PROTEÍNAS	%GLUCOSA	%GRASAS	%AGS	%AGM	%AGP
FRAP- LECHE	r	-0,211	0,417	-0,287	0,095	-0,095	0,118
	p	0,145	0,003	0,045	0,518	0,517	0,42
ABTS- LECHE	r	-0,126	0,078	-0,011	0,302	-0,291	-0,178
	p	0,403	0,607	0,941	0,041	0,05	0,237
DPPH- LECHE	r	-0,189	-0,015	0,011	-0,225	-0,236	0,074
	p	0,256	0,929	0,946	0,174	0,154	0,66

AGM = Ácidos Grasos Monoinsaturados

AGP = Ácidos Grasos Poliinsaturados

AGS = Ácidos Grasos Saturados

De tal forma que dicho porcentaje en los hidratos de carbono es directamente proporcional con respecto a la capacidad antioxidante de la leche analizada mediante el método FRAP mientras que en las grasas se encuentra de manera inversamente proporcional, siendo estos resultados estadísticamente significativos.

Y al analizar al detalle dentro de las grasas, los subtipos de éstas, se ha visto que tanto los ácidos grasos monoinsaturados (AGM) como los saturados (AGS) se han relacionado de forma significativa con la capacidad antioxidante de la leche medida mediante el método ABTS. Pero en el caso de los AGM lo hace de forma inversamente proporcional, es decir, a mayor porcentaje de AGM dietético menor es la capacidad antioxidante de la leche. Lo contrario ocurre con los AGS.

5.4 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA CON EL CONTENIDO DE MICRONUTRIENTES DE LA DIETA MATERNA (I): VITAMINAS

Se detallan a continuación el análisis de correlación realizado entre la capacidad antioxidante total de leche materna con el contenido de la dieta materna en lo que a micronutrientes se refiere, es decir, vitaminas y minerales (tablas 18 a 20).

TABLA 18: RELACIÓN CAT LECHE Y VITAMINAS DIETA MATERNA (I)

MÉTODO	Coefficiente correlación	VIT-A	VIT-B1	VIT-B2	VIT-B6	VIT-B12
FRAP- LECHE	r	-0,189	0,164	0,169	0,307	0,254
	p	0,194	0,261	0,245	0,032	0,078
ABTS- LECHE	r	0,344	0,07	0,247	0,073	0,192
	p	0,019	0,645	0,098	0,629	0,201
DPPH- LECHE	r	-0,062	-0,172	0,108	-0,009	0,032
	p	0,713	0,303	0,52	0,956	0,85

VIT: Vitamina

TABLA 19: RELACIÓN CAT LECHE Y VITAMINAS DIETA MATERNA (II)

MÉTODO	Coefficiente correlación	VIT-C	VIT-D	VIT-E	NIACINA	PANTO
FRAP- LECHE	r	0,295	-0,111	0,018	-0,037	-0,066
	p	0,039	0,446	0,902	0,803	0,65
ABTS- LECHE	r	0,117	-0,126	-0,057	0,172	0,169
	p	0,439	0,403	0,706	0,254	0,261
DPPH- LECHE	r	0,056	-0,058	-0,178	0,003	0,054
	p	0,739	0,731	0,284	0,985	0,749

VIT: Vitamina

PANTO: Pantoténico

TABLA 20: RELACIÓN CAT LECHE Y VITAMINAS DIETA MATERNA (III)

MÉTODO	Coefficiente correlación	BIOTINA	ÁCIDO FÓLICO	SODIO	POTASIO	CALCIO
FRAP- LECHE	r	0,177	0,005	0,02	-0,147	-0,154
	p	0,224	0,97	0,89	0,314	0,289
ABTS- LECHE	r	0,25	0,297	0,13	0,212	0,17
	p	0,094	0,045	0,39	0,156	0,257
DPPH- LECHE	r	0,025	0,093	0,068	-0,085	-0,021
	p	0,883	0,579	0,685	0,611	0,902

Al analizar la posible relación entre la ingesta materna de micronutrientes con la capacidad antioxidante total de la leche materna destaca que entre todo el grupo de vitaminas, serán las vitaminas del grupo A, B6, C y ácido fólico las que se han relacionado de una forma positiva con dicha capacidad. Es decir, que a mayor cantidad de ingesta materna de estas vitaminas, parece existir una mayor capacidad antioxidante de la leche.

5.5 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA CON EL CONTENIDO DE MICRONUTRIENTES DE LA DIETA MATERNA (II): MINERALES

Se detalla a continuación el análisis de la relación entre la capacidad antioxidante total de la leche humana por los tres métodos y el contenido de minerales de la dieta materna.

TABLA 21: RELACIÓN CAT LECHE Y MINERALES DIETA MATERNA (I)

MÉTODO	Coefficiente correlación	FÓSFORO	MAGNESIO	HIERRO	ZINC
FRAP- LECHE	r	0,01	0,284	0,037	-0,022
	p	0,948	0,048	0,803	0,88
ABTS- LECHE	r	0,226	0,129	0,016	0,142
	p	0,13	0,392	0,918	0,346
DPPH- LECHE	r	-0,063	-0,01	-0,079	-0,044
	p	0,705	0,952	0,638	0,794

TABLA 22: RELACIÓN CAT LECHE Y MINERALES DIETA MATERNA (II)

MÉTODO	Coefficiente correlación	YODO	COBRE	COLORO	MANGANESO	SELENIO
FRAP- LECHE	r	-0,002	0,019	0,073	-0,088	0,046
	p	0,989	0,896	0,62	0,548	0,755
ABTS- LECHE	r	0,101	0,387	-0,038	-0,136	0,035
	p	0,506	0,008	0,803	0,368	0,82
DPPH- LECHE	r	-0,008	0,099	-0,088	-0,054	-0,16
	p	0,963	0,553	0,6	0,747	0,338

Respecto a su relación con los minerales (tablas 21 y 22), son el magnesio y el cobre los que se han obtenido resultados con significación estadística, siendo además esta correlación positiva, es decir, que a mayores niveles de estos, en la dieta materna se ha obtenido en nuestro estudio mayor capacidad antioxidante total de la leche.

El caso del cobre de la dieta merece mención especial. Se trata también de un metal de transición similar al hierro. Además su función es muy similar a éste pues cataliza los mismos procesos. Por ello, debido al importante papel que juega en los procesos de oxidación y de ahí que su correlación con la capacidad antioxidante de la leche humana sea tan importante con una “p” muy significativa (concretamente de 0.008).

Este metal actúa en las reacciones de lipoperoxidación como catalizador. Por ello se usa con frecuencia *in vitro* para estimular la lipoperoxidación y se ha visto que en sus dos formas posibles (cúprica y cuprosa) posee mayor capacidad que el hierro para formar especies reactivas de oxígeno, produciendo un mayor daño a bases del ADN así como la rotura de sus hebras.

Y a diferencia del hierro, la peroxidación lipídica que es catalizada por el cobre puede tener lugar sin la producción de radical superóxido y es independiente del peróxido de hidrógeno y del radical hidroxilo. (Brezova et al., 2003).

Hay varios estudios *in vitro* que ha demostrado el papel que juega el cobre en la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y más aún en las de alta densidad (HDL). Además de los iones de cobre libres, hay enzimas como la ceruloplasmina que intervienen en la oxidación de las LDL. Ésta última actúa a su vez como fuente de cobre que puede ser atacada por radicales libres como el peroxinitrato y ello se verá favorecido ante un exceso de este mineral. (Haidari et al., 2001). Por el contrario, si hay un déficit de este mineral puede producirse la disminución de la capacidad de las células de producir enzimas antioxidantes como la SOD, lo que daría lugar a un aumento del daño oxidativo producido por radicales oxigénicos (Singh et al., 2007).

5.6 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA CON LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN PLASMA MATERNO

Se ha analizado 3 marcadores de estrés oxidativo tanto en plasma como en orina maternos y son malonildialdehido (MDA), los grupos carbonilo (GC) y el 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina (8OHdG).

En lo que al plasma se refiere, se ha obtenido una correlación positiva entre la capacidad antioxidante de la leche materna con 2 de los 3 marcadores de estrés oxidativo medidos en plasma materno, concretamente el MDA y los GC (tabla 23).

TABLA 23: RELACIÓN CAT LECHE Y MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO EN PLASMA MATERNO

MÉTODO	Coefficiente correlación	MDA-PLASMA	GC-PLASMA	8OHdG-PLASMA
FRAP-LECHE	r	0,001	-0,121	0,07
	p	0,997	0,422	0,661
ABTS-LECHE	r	0,53	-0,653	-0,092
	p	0,001	0,001	0,573
DPPH-LECHE	r	0,445	-0,336	-0,009
	p	0,008	0,045	0,959

MDA = malonildialdehido
 8OHdG = 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina
 GC = grupos carbonilo

El caso del MDA ha sido estadísticamente significativo tanto con la técnica ABTS como con la DPPH y dicha correlación es positiva por lo que a mayores niveles plasmáticos de MDA materno, mayor es la capacidad antioxidante de la leche materna. Hay que recordar que la lipoperoxidación constituye el “patrón oro” para probar la función de los radicales libres en algún tipo de daño celular, y aunque hay varias formas de medirla, la más destacada es la que mide el MDA que es un compuesto que va a reaccionar con el ácido tiobarbitúrico. Por tanto, el contenido de MDA en plasma

materno, en este caso, reflejará el daño oxidativo lipídico materno estando ambos relacionados de una manera proporcional. (Shohi et al., 2004).

En el caso de los GC también se ha obtenido significación estadística en ambos métodos pero en este caso de una forma inversamente proporcional. Este marcador permite realizar la evaluación del daño oxidativo a las proteínas. (Friel et al., 2011).

No se ha obtenido ningún resultado estadísticamente significativo al relacionar la capacidad antioxidante total de la leche con niveles de antioxidantes como los polifenoles, entre otros (tabla 24).

TABLA 24: RELACIÓN CAT LECHE Y OTROS MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO EN PLASMA MATERNO

MÉTODO	Coefficiente correlación	α -TOCOFEROL	POLIFENOLES
FRAP- LECHE	r	-0,141	-0,09
	p	0,366	0,585
ABTS- LECHE	r	0,227	-0,08
	p	0,16	0,638
DPPH- LECHE	r	-0,339	0,181
	p	0,05	0,331

5.7 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA CON LOS MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN ORINA MATERNA

Se han analizado los marcadores de daño oxidativo anteriormente comentados pero ahora a nivel de la orina materna (tabla 25).

TABLA 25: RELACIÓN CAT LECHE Y MARCADORES DE DAÑO
OXIDATIVO EN ORINA MATERNA

MÉTODO	Coefficiente correlación	GC-ORINA	MDA-ORINA	8OHdG-ORINA
FRAP- LECHE	r	-0,008	-0,099	0,04
	p	0,96	0,513	0,841
ABTS- LECHE	r	0,146	0,334	-0,014
	p	0,351	0,028	0,943
DPPH- LECHE	r	0,011	-0,169	-0,099
	p	0,95	0,325	0,668

MDA = malonildialdehido
8OHdG = 8-hidroxi-2'-deoxyguanosina
GC = grupos carbonilo

Al analizar los marcadores de estrés oxidativo en orina materna, se ha obtenido significación estadística en el caso también del MDA en relación a la capacidad antioxidante de la leche de forma similar a la obtenida en plasma materno. A mayores niveles de MDA en orina materna, mayor oxidación lipídica y se relaciona con una mayor capacidad antioxidante de la leche humana. Aunque a diferencia de lo ocurrido a nivel plasmático, aquí sólo se ha obtenido significación estadística con el método ABTS y no así con el DPPH, como ocurría a nivel plasmático.

5.8 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE MATERNA CON RESPECTO A LA DEL PLASMA MATERNO

Y finalmente se realizó un estudio comparativo entre la capacidad antioxidante total del plasma materno y la leche materna (tabla 26).

Todo ello fue analizado mediante los tres métodos habitualmente utilizados (FRAP, ABTS y DPPH).

TABLA 26: RELACIÓN CAT LECHE Y CAT PLASMA MATERNOS

MÉTODO	Coefficiente correlación	FRAP-PLASMA	ABTS-PLASMA	DPPH-PLASMA
FRAP-LECHE	r	0,151	0,217	-0,067
	p	0,353	0,179	0,664
ABTS-LECHE	r	-0,612	-0,323	-0,295
	p	0,000	0,051	0,061
DPPH-LECHE	r	-0,277	-0,098	-0,268
	p	0,132	0,598	0,125

De dicho análisis se deduce que cuanto mayor sea la capacidad antioxidante a nivel de plasma materno (medido por FRAP) menor es la capacidad antioxidante en la leche materna (medida por ABTS) y dichos resultados han alcanzado significación estadística (figura 7).

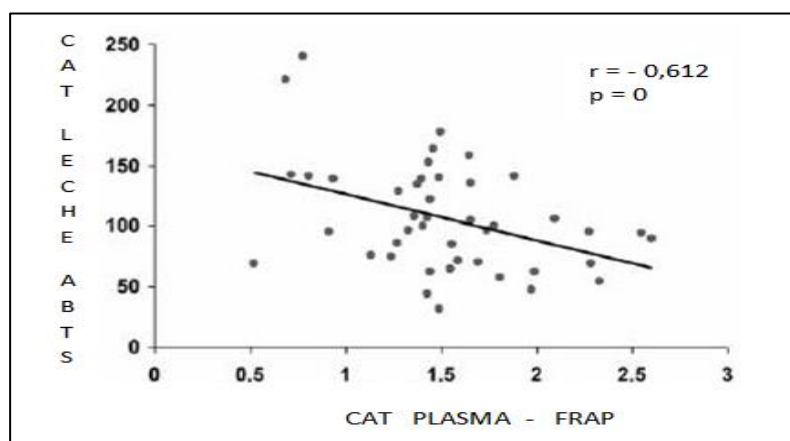


Fig 7: Correlación entre CAT de leche materna (ABTS) y el plasma materno (FRAP) en micromol/L.

Ocurre de forma similar al relacionar los datos obtenidos mediante ABTS en plasma materno y ABTS leche (figura 8), que se realizó en 72 madres, siendo también inversamente proporcionales. Éste no es estadísticamente significativo pero está muy próximo a serlo ($p = 0,051$) y por ello lo mencionamos.

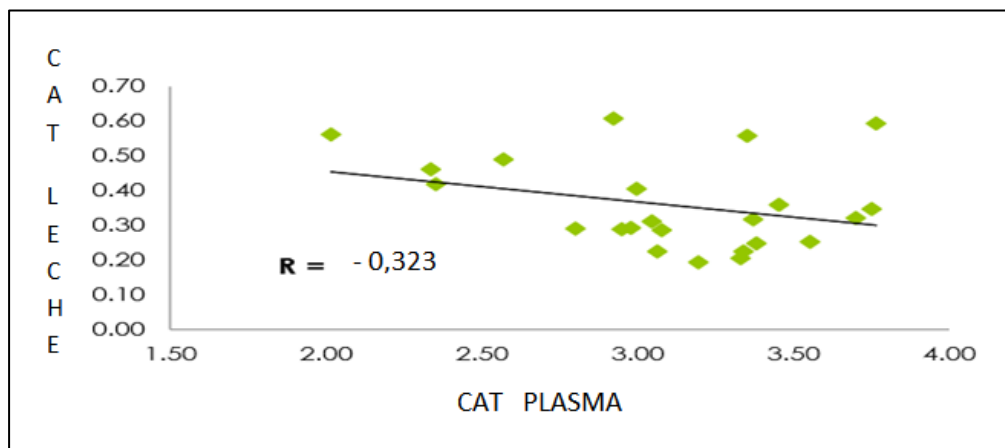


Fig 8: Correlación entre la CAT de plasma y leche maternos determinada por ABTS.

Así, es fundamental la correlación existente entre la capacidad antioxidante de la leche medida mediante ABTS y el estado oxidativo materno medido en este caso en plasma. Además, el ABTS es el método más influenciado por las grasas y de ahí su trascendencia.

Por tanto hay una relación inversa entre la capacidad antioxidante del plasma materno y la de la leche materna. Y ello es de suma importancia por su repercusión sobre el recién nacido.

Por ello cuanto menor sea el estrés oxidativo al que esté sometida la madre durante la gestación y lactancia, mayor será la capacidad antioxidante de su leche con las consecuencias favorables que ello supondrá para el recién nacido.

CONCLUSIONES

1. La dieta de las madres de nuestro estudio, a pesar de tener un aporte proteico adecuado, mostró un exceso en el consumo de grasas, sobre todo las saturadas, y un bajo consumo de hidratos de carbono.
2. Respecto a los micronutrientes, hay un bajo consumo de hierro, cobre, ácido fólico y yodo, y consumo excesivo de sodio.
3. La ferropenia es la carencia nutricional más frecuente en el embarazo (40%), a pesar de los suplementos que toman habitualmente las gestantes.
4. La capacidad antioxidante de la leche de las mujeres estudiadas fue superior a la publicada en la bibliografía, influenciada probablemente por el tipo de alimentación puesto que la dieta mediterránea es más rica en antioxidantes.
5. Se muestra que cuanto menor es el peso al nacer, mayor es la capacidad antioxidante de la leche materna. Ello puede ser debido a la adaptación biológica acontecida en los neonatos de bajo peso, aumentando así sus defensas frente al estrés oxidativo.
6. Se ha obtenido correlación entre la capacidad antioxidante de la leche y la dieta materna, siendo directamente proporcional a los niveles de vitaminas A, B6 y C, ácido fólico, magnesio y cobre e inversamente proporcionales al contenido dietético de grasas.
7. Se presenta asimismo una correlación entre la capacidad antioxidante de la leche humana y los niveles bioquímicos maternos, siendo directamente proporcional al nivel de hierro plasmático e inversamente proporcional al de VLDL colesterol.

8. El nivel hierro plasmático materno se correlaciona de forma directamente proporcional a la capacidad antioxidante total de la leche y es el único elemento analizado que ha obtenido significación estadística con los 3 métodos utilizados debido probablemente a su participación en los procesos oxidativos.
9. Se muestra una correlación inversa entre la capacidad antioxidante de leche y plasma maternos, de tal manera que cuanto menor es dicha capacidad en plasma mayor es a nivel de la leche materna lo cual es de suma importancia por su repercusión sobre el recién nacido.
10. Finalmente, cuanto mayor es el daño oxidativo materno (medido tanto en plasma como en orina maternos), mayor es la capacidad antioxidante de su leche.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abrams SA. Building bones in babies: can and should we exceed the human milk-fed infant's rate of bone calcium accretion? *Nutr Rev.* 2006; 64:487-494.
2. Abudu N, Miller JJ, Attaelmannan M, Levinson SS. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta.* 2004; 339:11-25.
3. Actis-Goretta L, Carrasquedo F, Fraga CG. The regular supplementation with an antioxidant mixture decreases oxidative stress in healthy humans. *Clin Chim Acta.* 2004; 349:97-103.
4. Aguilar MJ. Composición, propiedades y bioquímica de la leche humana. En: Aguilar MJ. *Lactancia Materna.* 1ª ed. Madrid: Elsevier Science; 2005. p. 51-61.
5. Ambring A, Friberg P, Axelsen M, Laffrenzen M, Taskinen MR, Basu S et al. Effects of a Mediterranean-inspired diet on blood lipids, vascular function and oxidative stress in healthy subjects. *Clin Sci.* 2004; 106:519-525.
6. Arbonés G, Carbajal A, Gonzalvo B. Nutrición y recomendaciones dietéticas para personas mayores. Grupo de trabajo «Salud pública» de la Sociedad Española de Nutrición. *Nutr Hosp.* 2003; 18:113-141.
7. Azeredo VB, Trugo NM. Retinol, carotenoids, adntocopherols in the milk of lactating adolescents and relationships with plasma concentrations. *Nutr.* 2008;24:133-139.
8. Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr.* 2003; 133:3248-3254.

9. Bellot P, Palazón JM. Enfermedades hepáticas durante el embarazo. *Gastroenterol Hepatol.* 2008; 31:16-29.
10. Benkalfat NB, Merzouk H, Bouanane S. Altered adipose tissue metabolism in offspring of dietary obese rat dams. *Clin Sci.* 2011; 121:19-28.
11. Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion.* 2007; 7:41–50.
12. Benzie IF, Szeto YT. Total antioxidant capacity of teas by the ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* 1999; 47:633-636.
13. Bianchi ML, Cruz A, Zanetti MA, Dorea JG. Dietary intake of selenium and its concentration in breast milk. *Biol Trace Elem Res.* 1999; 70:273-277.
14. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot.* 2003; 91:179-194
15. Borck L, Mullan W. Determination of indigenous antimicrobial proteins of milk. *Int Dai Fed.* 1993; 42: 29-31.
16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie.* 1995; 28: 25-30.
17. Brezova V, Valko M, Breza M, Morris H, Telser J, Dvoranova D et al. Role of radicals and singlet oxygen in photoactivated DNA cleavage by the anticancer drug camptothecin: an electron paramagnetic resonance study. *J Phys Chem.* 2003; 107:2415-2425.

18. Brea A. Tratamiento de la dislipemia en grupos especiales: ancianos y embarazadas. *Clin Invest Arterioscl.* 2011; 23:31-39.
19. Calvo G, López G. Ejercicio físico y radicales libres, ¿es necesaria una suplementación con antioxidantes? *Rev Int Med.* 2011; 12: 369-388.
20. Canfield LM, Giuliano AR, Graver, EJC. Carotenoids, retinoids, and vitamin K in human milk. En: Jensen RG. *Handbook of milk composition.* San Diego: Academic Press; 1995. p. 693-705.
21. Casey CE, Smith A, Zhang PC. Microminerals in human and animal milks. En: Jensen RG. *Handbook of milk composition.* San Diego: Academic Press; 1995. p. 622-674.
22. Castillo-Castañeda PC, Gaxiola-Robles R, Méndez-Rodríguez LC, Labrada-Martagón V, Zenteno-Savín T. Antioxidants, reactive oxygen species and oxidative damage associated to the presence of organochlorine pesticides in breast milk. *Nutr Hosp.* 2016; 33:422-430.
23. Cao G, Russell M., Lischner N, Prior RL. Serum antioxidant capacity is increased by consumption of strawberries, spinach, red wine or vitamin C in elderly women. *J Nutr.* 1998; 128: 2383-2390.
24. Cho SH, Choi YS. Lipid peroxidation and antioxidant status is affected by different vitamin E levels when feeding fish oil. *Lipids.* 1994; 29:47-52.
25. Crujeiras AB, Parra D, Abete I, Martínez JA. A hypocaloric diet enriched in legumes specifically mitigates lipid peroxidation in obese subjects. *Free Radic Res.* 2007; 41: 498-506.

26. Cuervo M, Corbalán M, Baladía E, Cabrerizo L, Formiguera X, Iglesias C et al. Comparison of dietary reference intakes between different countries of the European Union, The United States and the World Health Organization. *Nutr Hosp.* 2009; 24:384-414.
27. Cuco G, Fernandez-Ballart J, Sala J, Viladrich C, Iranzo R, Vila J et al. Dietary patterns and associated lifestyles in preconception, pregnancy and postpartum. *Eur J Clin Nutr.* 2006; 364-371.
28. D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita.* 2007; 43:348-361.
29. De Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delay J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation.* 1999; 99:779-785.
30. Del Prado M, Villalpando S, Elizondo A, Rodriguez M, Demmelmair H, Koletzko B. Contribution of dietary and newly formed arachidonic acid to human milk lipids in women eating a low-fat diet. *Am J Clin Nutr.* 2001; 74:242-247.
31. Demmers TA, Jones PJH, Wang Y, Krug S, Creutzinger V, Heubi J. Effects of early cholesterol intake on cholesterol biosynthesis and plasma lipids among infants until 18 months of age. *Pediatrics* 2005; 115:1594-1601.
32. Dimenstein R, Simplicio JL, Ribeiro KD, Melo IL. Retinol levels in human colostrum: influence of child, maternal and socioeconomic variables. *J Pediatr.* 2003; 796: 513-518.

33. Doshi S, Zucker S. Liver Emergencies during Pregnancy. *Gastroenterol Clin North Am.* 2013; 32:1213-1227.
34. Dudonne S, Vitrac X, Coutiere P, Woillez M, Merillon J. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOC and ORAC assays. *J Agric Food Chem.* 2009; 57:1768-1774.
35. Dueñas M, Hernández T, Estrella I. Comparative study of the phenolic composition in lentils processed with and without addition of commercial tannase. *J Food Proc and Preserv.* 2015; 33:695-713.
36. Dunstan JA, Breckler L, Hale J, Lehmann H, Franklin P, Lyons G et al. Supplementation with vitamins C, E, beta-carotene and selenium has no effect on anti-oxidant status and immune responses in allergic adults: a randomized controlled trial. *Clin Exp Allergy.* 2007; 37:180-187.
37. Engelmann M, Bobier R, Hiatt T, Cheng IF. Variability of the fenton reaction characteristics of the EDTA and citrate complexes of iron. *Biometals.* 2003; 6:519-527.
38. Entringer S. Impact of stress and stress physiology during pregnancy on child metabolic function and obesity risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2013; 16:320-327.
39. Esterbauer H, Schaur R, Zollener H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* 2001; 11:81-128.

40. 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.
41. Fang Y Z, Yang S, Wu G. Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition.* 2002; 18:872-879.
42. Feng P, Gao M, Holley T, Zhou T, Burgher A, Trabulsi J et al. Aminoacid composition and protein content of mature human milk from nine countries. *FASEB J.* 2009; 23(Suppl 1):448.
43. Fernandez-Pachón M, Villaño D, Troncoso A, García-Parrilla MC. Antioxidant capacity of plasma after red wine intake in human volunteers. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:5024-5029.
44. Fidler N, Salobir K, Stibilj V. Fatty acid composition of human milk in different regions of Slovenia. *Ann Nutr Metab.* 2000; 44:187-193.
45. Fito M, De la Torre R, Farre-Albaladejo M, Khymenetz O, Marruga J, Covas MI. Bioavailability and antioxidant effects of olive oil phenolic compounds in humans: a review. *Ann Ist Super Sanita.* 2007; 43:375-381.
46. Fito M, Guxens M, Corella D, Saez G, Estruch R, De la Torre R et al. Effect of a traditional Mediterranean diet on lipoprotein oxidation: a randomized controlled trial. *Arch Intern Med.* 2007; 167:1195-1203.

47. Flint DJ, Knight CH. Interaction of prolactin and growth hormone in the regulation of mammary gland function and epithelial cell survival. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 1997; 2:41-48.
48. Floegel A, Kim DO, Chung SJ, Song WO, Fernandez ML. Development and validation of an algorithm to establish a total antioxidant capacity database of the US diet. *Int J Food Sci Nutr*. 2010; 61:600-623.
49. Franke AA, Halm BM, Custer LJ, Tatsumura Y, Hebshi S. Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy. *Am J Clin Nutr*. 2006; 84:406-413.
50. Friel JK, Friesen RW, Harding SV, Roberts LJ. Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr Res*. 2004; 56:878-882.
51. 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; 69:160-164.
52. Fox PF, Kelly AL. Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects - Part 2. *Int Dairy J*. 2006; 16:517-532.
53. Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y et al. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J Clin Invest*. 2004; 114:1752-1761.
54. Gay J. Prevención y control de la carencia de hierro en la embarazada. *Rev Cubana Aliment Nutr*. 2008; 122:125-33.

55. Galili O, Versari D, Sattler KJ, Olson ML, Manneheim D, McConell JP et al. Early experimental obesity is associated with coronary endothelial dysfunction and oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007; 292: 904-911.
56. Gibson RA, Neuman MA, Makrides M. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants. *Eur Jour Clin Nutr.* 1997; 51:578-584.
57. Giribaldi M, Laura Cavallarín L, Baro C, Di Nicola P, Coscia A, Bertino E. Biological and Nutritional Aspects of Human Milk in Feeding of Preterm Infants. *Food Nutr Sci.* 2012; 3:1682-1687.
58. 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.
59. Granot E, Kohen R. Oxidative stress in childhood in health and disease states. *Clin Nutr.* 2004; 23:311.
60. Greer FR. Vitamin K status of lactating mothers and their infants. *Acta Paediatr.* 1999; 88:95-103.
61. Gudiel-Urbano M, Goñi I. Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Arch Latinoamer Nutr.* 2001; 51:332-339.
62. Gülçin İ. Antioxidant activity of food constituents: an overview. *Arch Toxicol.* 2012; 86:345-391.

63. Haidari M, Javadi E, Kadkhodae M, Sanati A. Enhanced susceptibility to oxidation and diminished vitamin E content of LDL from patients with stable coronary artery disease. *Clin Chem.* 2001; 47:1234-1240.
64. Halliwell B, Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol.* 2004; 142:231-255.
65. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev.* 2012; 70:257-265.
66. Hamosh M, Bitman J. Human milk in disease: lipids composition. *Lipids.* 1992; 27:848-857.
67. Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegyi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2004; 89: 518-520.
68. Hernell O, Lönnerdal B. Iron status of infants fed low iron formula: no effect of added bovine lactoferrin or nucleotides. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:858-864
69. 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):S140-144.
70. Hicks JJ, Torres-Ramos YD, Sierra-Vargas MP. Estrés oxidante, concepto y clasificación. *Rev Endocrinol Nutr.* 2006; 14:223-226.

71. Hinkle S, Sharma AJ, Swan DW. Excess gestational weight gain is associated with child adiposity among mothers with normal and overweight prepregnancy weight status. *J Nutr.* 2012; 142:1851-1858.
72. Hirvi Y, Griffiths MW. Milk catalase activity as an indicator of thermization treatments used in the manufacture of cheddar cheese. *J Dairy Sci.* 1998; 81:338-345.
73. Hosea HJ, Cicalo MC, Holland CD, Field CJ. The immunological components of human milk. *Adv Food Nutr Res.* 2008; 54:45-80.
74. Huang HY, Appel LJ, Croft KD, Miller ER, Mori TA, Puddey IB. Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2002; 76:549-555.
75. 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; 62:231-236.
76. Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci.* 2012; 37:503-517.
77. Jensen RG. The lipids in human milk. *Prog Lipid Res.* 1996; 35:53-92.
78. Jing L, Kumari S, Mendeleev N, Li AP. Coenzyme Q10 ameliorates ultraviolet B irradiation induced cell death through inhibition of mitochondrial intrinsic Cell Death Pahtway. *Int J Med Sci.* 2011; 12:8302-8315.

79. Jing L, He MT, Chang Y, Mehta SL, He QP, Zhang JZ et al. Coenzyme Q10 protects astrocytes from ROS-induced damage through inhibition of mitochondria-mediated cell death pathway. *Int J Biol Sci.* 2015; 11:59-66.
80. Johnson JB, Summer W, Cutler RG, Martin B, Hyun DH, Dixit VD et al. Alternate day calorie restriction improves clinical findings and reduces markers of oxidative stress and inflammation in overweight adults with moderate asthma. *Free Radic Biol Med.* 2007; 42:665-674.
81. Kasapović J, Pejić, Mladenović M, Radlović N, Pajović SB. Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional and mature human milk. *Turk J Pediatr.* 2005; 47:343-347.
82. Koletzko B, Rodriguez-Palmero M, Demmelmair H, Fidler N, Jensen R, Sauerwald T. Physiological aspects of human milk lipids. *Early Hum Develop.* 2001; 65:3-18.
83. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 2000; 20:699-722.
84. Kunz C, Lönnerdal B: Reevaluation of the whey protein/casein ratio of human milk. *Acta Pediatr.* 1992; 81:107-112.
85. Kuzawa C. You are what your mother ate? *Am J Clin Nutr* 2013; 97:1157-1158.
86. Ladino L, Moreno-Torres R, Campos D, Baltazar MC, Campoy C and the PREOBE Research Group. Association between women's nutrition during pregnancy and body composition of the offspring until 18 months. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 58:484-490.

87. Landete JM. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2012; 52:936-948.
88. Larque E, Zamora S, Gil A: Dietary trans fatty acids in early life: a review. *Early Hum Dev.* 2001; 65(Suppl):S31-S41.
89. Laskey MA, Pretince A, Hanratty LA, Jarjou LM, Dibba B, Beavan SR et al. Bone changes after 3 month of lactation: influence of calcium intake, breast-milk output and vitamin D-receptor genotype. *Am J Clin Nutr.* 1998; 67:685-692.
90. Lawrence RA, Lawrence RM. *Biochemistry of Human Milk.* En: Lawrence RA. *Breastfeeding: a guide for the medical profession.* 7ªed. Philadelphia: Elsevier; 2011. p. 102-118.
91. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2007; 37:7-36.
92. 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; 31:270-274.
93. Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89:210-215.
94. Levine R. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging and disease. *Free Radic Biol Med.* 2012; 32:790-796.

-
95. 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.
 96. Lien EL. Infant formulas with increased concentrations of alpha-lactalbumin. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77:1555-1558.
 97. Lindmark-Mansson H, Akesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr*. 2000; 84:S103-S110.
 98. Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra A. Free radicals, antioxidants and functional foods: impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4:118-126.
 99. Lobo GP, Amengual J, Palczewski G, Babino D, Von Lintig J. Carotenoid-oxygenases: key players for carotenoid function and homeostasis in mammalian biology. *Biochim Biophys Acta*. 2012; 1821: 78-87.
 100. Lönnerdal B. Effects of maternal dietary intake on human composition. *J Nutrition*. 1996; 116:499-513.
 101. Lönnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*. 2003; 77(Suppl):1537S-1543S.
 102. Lönnerdal B, Kelleher SL. Micronutrient transfer: infant absorption. *Adv Exp Med Biol*. 2009; 639:29-40.
 103. Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr*. 2010; 156 (Suppl): S26-S30.
 104. López Alvarez MJ. Proteins in human milk. *Breastfeed Rev*. 2007; 15:5-16.

105. Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *New Eng J Med*. 1991; 325:687-694.
106. Lucas A, Fewtrell MS; Morley R, Lucas PJ, Baker BA, Lister G et al. Randomized outcome trial of human milk fortification and developmental outcome in preterm infants. *Am J Clin Nutr*. 1996; 64:142-151.
107. Macías S, Rodríguez S, Ronayne P. Leche materna: composición y factores condicionantes de la lactancia. *Arch Argent Pediatr*. 2006; 104:423-430.
108. Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alphatocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab*. 2001; 45:82-85.
109. Mariscal-Arcas M, Rivas A, Monteagudo C, Granada A, Cerrillo I, Olea-Serrano F. Proposal of a Mediterranean diet index for pregnant women. *Br J Nutr*. 2009; 102:744-749.
110. Martinez M. Tissue levels of polyunsaturated fatty acids during early human development. *J Pediatr*. 1992; 120:129-138.
111. Martysiak-Zurowska D, Wenta W. A comparison of ABTS and DPPH for assessing the total antioxidant capacity of human milk. *Acta Sci Pol Technol Aliment*. 2012; 1:83-89.
112. 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; 16:577-586.

113. Maury-Sintjago E, Bravo-Henríquez A, Padilla E, Paz R, García D. Correlación entre la ingesta de micronutrientes (cobre, potasio, zinc y calcio) y el contenido en la leche materna. *Antropo*. 2012; 28:31-40.
114. Mena P, Milad A. Variaciones en la composición nutricional de la leche materna: algunos aspectos de importancia clínica. *Rev Chil Pediatr*. 1998; 69:116-121.
115. Michaelsen KF, Larsen PS, Thomsen BL, Samuelson G. The Copenhagen cohort study on infant nutrition and growth: breast milk intake, human milk macronutrient content and influencing factors. *Am J Clin Nutr*. 1994; 59:600-611.
116. Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, Silvestre D. Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal. *Nutr Hosp*. 2011; 26:722-728.
117. Mishra V, Baines M, Perry SE, McLaughlin PJ, Carson J, Wenstone R et al. Effect of selenium supplementation on biochemical markers and outcome in critically ill patients. *Clin Nutr*. 2007; 26:41-50.
118. Moltó-Puigmartí C, Castellote AI, López-Sabater MC. Ultra-high-pressure liquid chromatographic method for the analysis of tocopherols in human colostrum and milk. *J Chromatogr A*. 2009; 1216:4388-4394.
119. Moreiras O, Carbajal A, Cabrera L, Cuadrado C. Tablas de composición de alimentos. En: Moreiras O. *Guía de práctica clínica*. 17ª ed. Madrid: Ediciones Pirámide; 2015.
120. Moya M, Juste M, Cortes E, Carratala F. Fatty acid composition of mature breast milk according to the mothers diet during pregnancy. *Adv Exp Med Biol*. 2000; 478:405-406.

-
121. Muhlhausler S, Ong Y. The fetal origins of obesity: early origins of altered food intake. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2011; 11:189-197.
122. Nagao T, Komine Y, Soga S, Meguro S, Hase T, Tanaka Y et al. Ingestion of a tea rich in catechins leads to a reduction in body fat and malondialdehyde-modified LDL in men. *Am J Clin Nutr*. 2005; 81:122-129.
123. Nagasawa T, Kiyosawa I, Kuwahara K. Amounts of lactoferrin in human colostrum and milk. *J Dairy Sci*. 1972; 55:1651-1659.
124. Navarrete-Muñoz EM, Giménez M, García de la Hera M, Climent MD, Rebagliato M, Murcia M et al. Ingesta dietética y de suplementos de ácido fólico en mujeres embarazadas de Valencia. *Med Clin*. 2010; 135:637-643.
125. Neville MC. Determinants of milk volumen and composition: volume and caloric density of human milk. En: Neville MC. *Handbook of Milk Composition*. 1ªed. San Diego: Academic Press; 1995. p. 99-113.
126. Niklowitz P, Menke T, Giffei J, Andler W. Coenzyme Q10 in maternal plasma and milk throughout early lactation. *Biofactors*. 2005; 25:67-72.
127. Nilsson J, Pillai D, Önning G, Persson C, Nilsson Å, Åkesson B. Comparison of the 2,2'-azinobis-3-ethylbenzotiazol-6-sulfonic acid (ABTS) and ferric reducing anti-oxidant power (FRAP) methods to assess the total antioxidant capacity in extracts of fruit and vegetables. *Mol Nutr Food Res*. 2005; 49:239-246.
128. O'Connor D, Hall R, Adamkin D, Auestad N, Castillo M, Connor WE et al. Growth and development in preterm infants fed long-chain polyunsaturated fatty acids: a prospective randomized control trial. *Pediatrics*. 2001; 108:359-71.

129. Opara EC. Oxidative stress, micronutrients, diabetes mellitus and its complications. *J R Soc Health*. 2002; 122:28-34.
130. Ortega RM, Lopez-Sobaler AM, Quintas ME, Martinez RM, Andres P. The influence of smoking on vitamin C status during the third trimester of pregnancy and on vitamin C levels in maternal milk. *J Am Coll Nutr*. 1998; 17:379-384.
131. Ortega RM, López-Sabater AM, Andrés P, Martínez RM, Quintas ME. Supplementation with iron and folates during gestation: influence on zinc status in the mother and on zinc content in the maternal milk. *Med Clin*. 1998; 111:281-285.
132. Ortiz-Andrellucchi A, Sánchez-Villegas A, Ramírez-García O, Serra-Majem. Calidad nutricional de la dieta en gestantes sanas de Canarias. *Med Clin*. 2009; 133:615-621.
133. Owen CG, Whincup PH, Odoki K, Gilg JA, Cook DG. Infant feeding and blood cholesterol: a study in adolescents and a systematic review. *Pediatrics*. 2002; 110:597-608.
134. Pavey DE, Widdowson EM. Influence of dietary fat intake of the mother on composition of body fat of newborn guinea-pigs. *Proc Nutr Soc*. 1975; 34:107-108.
135. Pérez-Jiménez J, Arranz S, Tabernero M, Díaz-Rubio M, Serrano J, Goñi I et al. Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages. *Food Res Int*. 2008; 41:274-285.
136. Perrone S, Salvi G, Bellieni CV, Buonocore G. Oxidative stress and nutrition in the preterm newborn. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007; 45:178-182.

-
137. Picciano MF. Vitamins in milk. Watersoluble vitamins in human milk. En: Duggan C. Handbook of milk composition. San diego: Academic Press; 1995. p.675-688.
138. Pignatelli P, Ghiselli A, Buchetti B, Carnevale R, Natella F, Germano G et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. *Atherosclerosis*. 2006; 188:77-83.
139. Prentice A. Constituents of human milk. *Food and Nutr Bull*. 1996; 17:305-315.
140. Prentice A. Calcium requirements of breast-feeding mothers. *Nutr Rev*. 1998; 56:124-127.
141. Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Linde J, Bompadre S, Battino M et al. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stage of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res*. 2006; 40:199-206.
142. Ramakrishnan U, Grant F, Goldenberg T, Zongrone A, Martorell R. Effect of women's nutrition before and during early pregnancy on maternal and infant outcomes: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2012; 26:285-301.
143. Raupp P, Kries R, Schiedlauer D, Manz F. Biochemical evidence for the need of long-term mineral supplementation in an extremely low birth weight infant fed own mothers milk exclusively during the first six months of life. *Eur J Pediatr*. 2000; 149:806-808.

-
- 144.Reyes H. Características de la leche materna. En: Reyes H, Martínez A. Lactancia humana: bases para lograr su éxito. 1ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 80-86.
- 145.Rivero D, Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML, Valls-Bellés V, Codoñer P, Muñoz P. Inhibition of induced DNA oxidative damage by beers: correlation with the content of polyphenols and melanoidins. *J Agric Food Chem.* 2005; 53:3637-3642.
- 146.Roberts LJ, Oates JA, Linton MF, Fazio S, Meador BP, Gross MD et al. The relationship between dose of vitamin E and suppression of oxidative stress in humans. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43:1388-1393.
- 147.Roche E, Romero-Alvira D. Changes in DNA induced by oxidative stress. *Med Clin.* 2006; 106:144-153.
- 148.Rodríguez T, Peña M, Gómez N, Santisteban Y, Hernández M. Estrés oxidativo: genética, dieta y desarrollo de enfermedades. *Correo Cient Med.* 2015; 19:690-705.
- 149.Rodrigo R, Guichard C, Charles R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. *Fundam Clin Pharmacol.* 2007; 21:111-127.
- 150.Roginsky V, Lissi E. Review of methods to determine chain-breanking antioxidant activity in food. *Food Chem.* 2005; 129:1800-1805.
- 151.Román J. Efecto sobre la salud de la ingestión de cerveza sin alcohol y lúpulo en un colectivo de monjas de clausura. *Nutr Hosp.* 2005; 20:113-114.

152. Saker M, Soulimane MN, Merzouk SA, Merzouk H, Belarbi B, Narce M. Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2008; 141:95-99.
153. Salas-Salvado J, García-Arellano A, Estruch R, Márquez-Sandoval F, Corella D, Fiol M et al. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. *Eur J Clin Nutr* 2008. 62:651-659.
154. Salvini S, Sera F, Caruso D, Giovannelli L, Visioli F, Saieva C et al. Daily consumption of a high-phenol extra-virgin olive oil reduces oxidative DNA damage in postmenopausal women. *Br J Nutr.* 2006; 95:742-751.
155. Sanders TA. Essential fatty acid requirements of vegetarians in pregnancy, lactation and infancy. *Am J Clin Nutr.* 1999; 70:555-559.
156. Sastre J, Pallardó FV, García J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Rad Res.* 2000; 32:189-198.
157. Sauerwald TU, Demmerlmair H, Fidler N, Koletzko B. Polyunsaturated fatty acid supply with human milk. Physiological aspects and in vivo studies of metabolism. *Adv exp Med Biol.* 2000; 478:261-270.
158. Savić D, Vojinović J, Zvezdanović L, Cosić V, Savić V. Importance of breast-feeding in antioxidant defence. *Srparhceloklek.* 2005; 2:108-112
159. Semba RD, Delange F. Iodine in human milk: perspectives for infant health. *Nutr Rev.* 2001; 59:269-271.

-
160. Aranceta J, Serra L. Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. *Rev Esp Nutr Com.* 2011; 17:178-199.
161. Seviá L, Trujillano J, Serrano JC, Pamplona R, Badia M, Jové M et al. Plasma antioxidant capacity in critical polytraumatized patients: methods, severity and anatomic location. *Critical Care.* 2014; 18:434.
162. Shaler RJ. Suitability of human milk for the low birth weight infant. *Clin Perinatol.* 2005; 22:207-222.
163. Sharma J, Sharma A, Bahadur A, Vimala N, Satyam A, Mittal S. Oxidative stress markers and antioxidant levels in normal pregnancy and preeclampsia. *Int J Gynecol.* 2006; 94:2-27.
164. Shohi H, Oguchi S, Shimizu T, Yamashiro Y. Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in infants. *Pediatr Res.* 2003; 53:850-852.
165. Shohi H, Shimizu T, Shinoharak, Oguchi S, Shiga S, Yamashiro Y. Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal.* 2004; 89:136-138.
166. Sies H, Stahl W, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. *J Nutr.* 2005; 135: 969-972.
167. Silencio L, Santiago MS. Antioxidant role of ascorbic acid and his protective effects on chronic diseases. En: Morales-González M. *Oxidative stress and chronic degenerative diseases: a role for antioxidants.* 7ªed. México: Elsevier; 2013.

-
168. Singh M. Role of micronutrients for physical growth and mental development. *Indian J Pediatr.* 2004; 71:59-62.
169. Singh D, Nath K, Sharma YK. Response of wheat seed germination and seedling growth under copper stress. *J Environ Biol.* 2007; 28:409-141.
170. Srigiridhar K, Nair KM, Subramanian R, Singotamu L. Oral repletion of iron induces free radical mediated alterations in the gastrointestinal tract of rat. *Mol Cell Biochem.* 2001; 219:91-98.
171. Tang PH, Miles MV, Steele P. Determination of coenzyme Q10 in human breast milk by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr.* 2006; 20:1336-1343.
172. Taylor SN, Wagner CL, Hollis BW. Vitamin D supplementation during lactation to support infant and mother. *J Am Coll Nutr.* 2008; 27:690-701.
173. Tigas S, Sunehag A, Haymond MW.: Metabolic adaptation to feeding and fasting during lactation in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87:302-307.
174. Tijerina-Sáenz A, Innis SM, Kitts DD. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. *Acta Paediatr.* 2009; 98:1793-1798.
175. Toescu V, Nuttall S, Martin U, Nighttingale P, Kendal M, Brydon P. Changes in plasma lipids and markers of oxidative stress in normal pregnancy and pregnancies complicated by diabetes. *Clin Sci.* 2004; 106:93-98.

-
176. Torres A, Farré R, Lagarda MJ, Monleón J. Determination of glutathione peroxidase activity in human milk. *Nahrung*. 2003; 47:430-433.
177. Toxqui L, Piero AD, Courtois V, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ, Vaquero M. Deficiencia y sobrecarga de hierro: implicaciones en el estado oxidativo y la salud cardiovascular. *Nutr Hosp*. 2010; 25:350-365.
178. Traber MG. Vitamin E and K interactions, a 50-year-old problem. *Nutr Rev*. 2008; 66:624-629.
179. Turoli D, Testolin G, Zanini R., Bellu R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr*. 2004; 93:1569-1574.
180. Tysandier V, Feillet-Coudray C, Caris-Vayrat C, Guillard JC, Coudray C, Bureau S et al. Effect of tomato product consumption on the plasma status of antioxidant microconstituents and on the plasma total antioxidant capacity in healthy subjects. *J Am Coll Nutr*. 2004; 23:148-156.
181. Tyson J, Burchfield J, Sentance F, Mize M, Uauy R, Eastbur J. Adaptation of feeding to a low fat yield in breast milk. *Pediatrics*. 1992; 89:215-222.
182. Uauy R, Calderón F, Mena P. Essential fatty acid in somatic growth and brain development. *World Rev Nutr Diet*. 2001; 89:134-160.
183. Uauy R, Mena P, Peirano P. Dietary polyunsaturated fatty acids for optimal neurodevelopment. Recommendations for perinatal nutrition. En: Benedich RJ. Preventive Nutrition. The comprehensive guide for health professionals. 2ª ed. Totowa: Humana Press Inc; 2001. p. 415-431.

184. Uruakpa FO, Ismond MA, Akobundu E. Colostrum and its benefits: a review. *Nutr Res.* 2002; 22:755-67.
185. Valls-Bellés V, Codoñer-Franch P, González ML, Muñiz P. Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante “in vivo”. Monografía. Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud; 2005.
186. 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.
187. Van Beusekom CM, Martini IA, Rutgers HM, Boersma ER, Muskiet FA. A carbohydrate rich diet not only leads to incorporation of medium-chain fatty acids in milk triglycerides but also in each milk-phospholipid subclass. *Am J Clin Nutr.* 1990; 52:326-334.
188. Varga Z, Ujhelyi L, Kiss A, Balla J, Czompa A, Antus S. Effect of silybin on phorbol myristate acetate-induced protein kinase C translocation, NADPH oxidase activity and apoptosis in human neutrophils. *Phytomedicine.* 2004; 11:206-212.
189. Vidurizaga-de Amezaga CA, Zulet MA, Martí A, Martínez-González MA, Martínez JA. The mediterranean food pattern: a good recipe for patients with the metabolic syndrome. *Mediterr J Nutr Metab.* 2008; 1:3-14.
190. Vincent HK, Innes KE, Vincent KR. Oxidative stress and potential interventions to reduce oxidative stress in overweight and obesity. *Diabetes Obes Metab.* 2007; 9:813-839.

191. Vio F, Salazar G, Infante C. Smoking during pregnancy and lactation and its effects on breast-milk volumen. *Am J Clin Nutr.* 1991; 86:737-740.
192. Visioli F, Caruso D, Grande S, Bosisio R, Villa M, Galli G et al. Virgin olive oil study: vasoprotective potential of extra virgin olive oil in mildly dyslipidemic patients. *Eur J Nutr.* 2005; 44:121-127.
193. Von Kries R, Shearer M, Mccarthy PT, Haug M, Harzer G, Gobel U. Vitamin K content of maternal milk: influence of the stage of lactation, lipid composition and vitamin K supplements given to the mother. *Pediatr Res.* 1987; 22; 513-517.
194. Wally MI, Hornig M, Trivedi M, Hodson N, Kini R, Ohta A et al. Prenatal and postnatal epigenetic programming: implications for gastrointestinal, immune and neuronal function in autism. *Autism Res Treat.* 2012; 2:190-230.
195. Wauben I, Gibson R, Atkinson S. Premature infants fed mothers' milk to 6 months corrected age demonstrate adequate growth and zinc status in the first year. *Early Hum Dev.* 1999; 54:181-194.
196. Wester R, Naylor A. Lactation management self-study modules. 4^aed. Vermont: Wellstart International; 2013.
197. Wide CJ, Addev CV, Boddy LM, Peaker M. Autocrine regulation of milk secretion by protein in milk. *Biochem J.* 2005; 305:51-58.
198. Yoshihara E, Masaki S, Matsuo Y, Chen Z, Tian H, Yodoi J. Thioredoxin/Txnip: redoxosome, as a redox switch for the pathogenesis of diseases. *Front Immunol.* 2014; 4:514.

- 199.Zago MP, Oteiza I. The antioxidants properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med.* 2001; 31:266-271.
- 200.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; 45:150-154.
- 201.Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase (SOD) 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; 33:337-349.

ANEXOS

ANEXO 1: HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Buenos días,

Nos dirigimos a usted para informarle sobre un estudio de investigación en el que se le invita a participar. El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Dr. Peset. Nuestra intención es que usted reciba la información correcta y suficiente para que pueda evaluar y juzgar por sí mismo si quiere o no que su hijo/a participe en este estudio. Le rogamos lea con atención y si le surgen dudas, no dude en preguntárnoslas para que nosotros se las aclaremos. Además, puede consultar con las personas que considere oportuno sobre este tema.

El Servicio de Pediatría del Hospital Doctor Peset está llevando a cabo una investigación sobre *“La influencia de los factores dietéticos maternos durante la gestación en la calidad de la leche y su repercusión en el recién nacido”*. Este trabajo de investigación se realiza de forma conjunta con el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de Valencia.

Recordemos que la evidencia científica avala la superioridad nutricional de la leche materna para la alimentación del recién nacido. Asimismo, el amamantamiento comporta grandes beneficios no sólo para la salud del lactante, sino también para la salud de la madre.

La composición de la leche humana es muy dinámica y múltiples son los factores que pueden modificarla. Entre ellos destaca la alimentación de la madre no sólo tras el parto sino también durante la gestación e incluso antes de la concepción.

Por ello, esta investigación tratará de averiguar si la nutrición en la gestante influye en las características de su leche así como en el recién nacido.

Sólo pueden participar aquellas madres que vayan a ofrecerle a su hijo lactancia materna exclusiva, tengan un bebé sano, ellas mismas estén sanas con adecuado estado nutricional y sin restricciones dietéticas específicas. Además, que no fumen ni tomen bebidas estimulantes ni suplementos vitamínicos más allá del yodo y ácido fólico habituales.

Le indico a continuación de forma detallada en qué consiste.

Todo ello será llevado a cabo durante su estancia en Sala de Maternidad, sin que ello interfiera de ninguna manera en la duración de la misma.

Por un lado, se rellenarán dos cuestionarios dietéticos. Uno de ellos será retrospectivo registrando de forma minuciosa todo aquello que haya ingerido el día anterior al registro, se realizará el primero o segundo día postparto. El otro será prospectivo y consistirá en ir cumplimentando el cuestionario que le adjuntaremos donde irá anotando todos los alimentos que tome los tres días del registro.

Por otro lado, previo al alta, a las 48 horas postparto, se llevará a cabo un análisis de sangre (20 cc) en ayunas así como la extracción de una pequeña muestra de leche (10 cc de calostro) obtenida mediante el extractor eléctrico Symphony de Medela con un equipo desechable único, que está disponible en la propia sala de maternidad.

Si desea usted participar, le agradeceré que firme la hoja de consentimiento informado.

Debe saber que la participación en este estudio es voluntaria, y que puede decidir no participar o cambiar su decisión y retirar el consentimiento en cualquier momento, sin que por ello se altere la relación con su médico ni se produzca perjuicio alguno en su tratamiento.

El tratamiento, la comunicación y la cesión de los datos de carácter personal de todos los sujetos participantes se ajustará a lo dispuesto en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre de protección de datos de carácter personal. De acuerdo a lo que

establece la legislación mencionada, usted puede ejercer los derechos de acceso, modificación, oposición y cancelación de datos, para lo cual deberá dirigirse a su médico responsable del estudio.

Los datos recogidos para el estudio estarán identificados mediante un código, y sólo los médicos responsables del estudio, o colaboradores, podrán relacionar dichos datos con su hijo/a y con su historia clínica. Por lo tanto, su identidad no será revelada a persona alguna salvo excepciones, en caso de urgencia médica o requerimiento legal.

Quedo a su disposición para cualquier duda o aclaración.

Dra Almudena Navarro, teléfono de contacto 963862500.

Muchas gracias.

ANEXO 2: DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Don/Doña, deaños de edad y con DNI nº, manifiesta que he sido informada sobre los beneficios y los riesgos que podría suponer el análisis de la leche, para llevar a cabo la investigación: “La influencia de los factores dietéticos maternos durante la gestación en la calidad de la leche y su repercusión en el recién nacido”.

- He sido informado/a de los posibles perjuicios que pueda producir la extracción de una muestra de leche.
- He leído la hoja informativa que me ha sido entregada.
- He tenido oportunidad de efectuar preguntas sobre el estudio.
- He recibido respuestas satisfactorias.
- He recibido suficiente información en relación con el estudio.
- He hablado con el Dr./Investigador: Almudena Navarro Ruiz.
- Entiendo que la participación es voluntaria.
- Entiendo que puedo abandonar el estudio:
 - Cuando lo desee.
 - Sin que tenga que dar explicaciones.
 - Sin que ello afecte a mis cuidados médicos.

Considero que he comprendido suficientemente el alcance de la participación en este estudio que no le reporta perjuicio personal alguno y, sin embargo, puede contribuir al avance científico con importantes beneficios para la salud de la población y que se me autorizará a acompañar y estar presente en las actuaciones que se lleven a cabo con motivo del presente estudio.

También he sido informado de forma clara, precisa y suficiente de los siguientes extremos que afectan a los datos personales que se contienen en este consentimiento y en la ficha o expediente que se abra para la investigación:

- Estos datos serán tratados y custodiados con respeto a mi intimidad y a la vigente normativa de protección de datos.

- Sobre esos datos me asisten los derechos de acceso, rectificación, cancelación y oposición que podré ejercitar mediante solicitud ante el investigador responsable en la dirección de contacto que figura en este documento.

- Estos datos no podrán ser cedidos sin mi consentimiento expreso y no lo otorgo en este acto.

He sido también informado/a 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.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a:

- Toma de datos de mi Historia Clínica
- Estudio clínico de mi hijo/a
- Extracción de leche
- Análisis de mi leche.
- Y que todo ello sea utilizado para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Valencia, a.....dede 20.....

Fdo.

ANEXO 3: HOJA DE RECOGIDA DE DATOS

Cuestionario n°:

Fecha de recogida de datos: / /

DATOS DE LA MADRE

Edad años
Peso al inicio embarazo kg
Peso al final embarazo kg
Altura m
IMC kg/m ²
Paridad	G ... P ... A ...

DATOS DEL HIJO

Fecha Nacimiento / /
Edad Gestacional
Apgar 1 min / 5 min /
Peso nacimiento kg
Longitud nacimiento cm

ANEXO 4: RECORDATORIO DIETÉTICO 24 HORAS

Cuestionario de recuerdo de 24 horas

Trate de recordar todos los alimentos y bebidas que consumió ayer.

Fecha correspondiente al día de recuerdo:	Edad:
Nombre:	Sexo:
Actividad física (baja, moderada, elevada):	Peso (kg):
Consumo de suplementos (tipo y cantidad):	Talla (m):

DESAYUNO	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	
	Azúcar:	
COMIDA	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	
	Bebidas:	
	Pan:	
	Aceite (tipo):	
MERIENDA	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	
CENA	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	
	Bebidas:	
	Pan:	
	Aceite (tipo):	
ENTRE HORAS	Hora:	Lugar:
Menús y Proceso culinario	Alimentos (calidad y cantidad)	

La comida anterior, ¿ha sido diferente por algún motivo? SÍ NO

En caso afirmativo, indique por qué:

ANEXO 5: REGISTRO DIETÉTICO PROSPECTIVO 3 DÍAS**Hoja de Menús****PRIMER DÍA**

Fecha:

Día de la semana:

Hora: Lugar:	DESAYUNO
Hora: Lugar:	MEDIA MAÑANA
Hora: Lugar:	COMIDA
Hora: Lugar:	MERIENDA
Hora: Lugar:	CENA
Hora: Lugar:	OTRAS

Hoja de Menús**SEGUNDO DÍA**

Fecha:

Día de la semana:

Hora: Lugar:	DESAYUNO
Hora: Lugar:	MEDIA MAÑANA
Hora: Lugar:	COMIDA
Hora: Lugar:	MERIENDA
Hora: Lugar:	CENA
Hora: Lugar:	OTRAS

Hoja de Menús**TERCER DÍA**

Fecha:
Día de la semana:

Hora: Lugar:	DESAYUNO
Hora: Lugar:	MEDIA MAÑANA
Hora: Lugar:	COMIDA
Hora: Lugar:	MERIENDA
Hora: Lugar:	CENA
Hora: Lugar:	OTRAS

