

**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Pediatría y Obstetricia**



**Estudio de la suplementación de la dieta materna con cerveza sin alcohol, su efecto sobre las propiedades antioxidantes de la leche humana y el metabolismo oxidativo infantil**

**TESIS DOCTORAL**

**Dña. M<sup>a</sup> Teresa Hernández Aguilar**

**Valencia, 2015**

**Facultad de Medicina**  
**Departamento de Pediatría y Obstetricia**



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la suplementación de la dieta materna con cerveza sin alcohol, su efecto sobre las propiedades antioxidantes de la leche humana y sobre el metabolismo oxidativo infantil**

**Dirigida por:**

Dra. Dña. Pilar Codoñer Franch

Dra. Dña. Victoria Valls Bellés

**Presentada por:**

Dña. M<sup>a</sup> Teresa Hernández Aguilar

Valencia, 2015

## TÍTULO

Estudio de la suplementación de la dieta materna con cerveza sin alcohol,  
su efecto sobre las propiedades antioxidantes de la leche humana y sobre  
el metabolismo oxidativo infantil



M<sup>a</sup> Teresa Hernández Aguilar

## **TESIS DOCTORAL**

**Estudio de la suplementación de la dieta materna con cerveza sin alcohol, su efecto sobre las propiedades antioxidantes de la leche humana y el metabolismo oxidativo infantil**

**Tesis presentada para optar al Grado de Doctor por Doña M<sup>a</sup> Teresa Hernández Aguilar, licenciada en Medicina y Cirugía, con DNI: 00380415H**

Firmado: M<sup>a</sup> Teresa Hernández Aguilar

Valencia, 2015

### **Directoras:**

Profesora Dra. Dña. Pilar Codoñer Franch

Profesora Dra. Dña. Victoria Valls Bellés

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

**Dra. Victoria Valls Bellés**, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Asociada del Área de Fisiología. Facultad de Medicina, Universidad Jaume I de Castellón.

**INFORMAN** que: **Dña. M<sup>a</sup> Teresa Hernández Aguilar**, licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad Complutense de Madrid ha realizado bajo nuestra dirección, en el Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia el presente trabajo titulado: “**Estudio de la suplementación de la dieta materna con cerveza sin alcohol, su efecto sobre las propiedades antioxidantes de la leche humana y el metabolismo oxidativo infantil**” y autorizan su presentación como Tesis Doctoral para optar al Grado de Doctor.

Y para que así conste a todos los efectos oportunos, expiden y firman el presente informe, en Valencia, a 30 de junio de 2015 :

Dra. Pilar Codoñer Franch

Dra. Victoria Valls Bellés

*“... que la vida es eso,  
Continuar el viaje,  
Perseguir tus sueños,  
Destruir el tiempo,  
Correr los escombros,  
Y destapar el cielo”.*

*(M. Benedetti)*

**A mis padres, a mi marido y a mis hijos.  
Sin vosotros nada habría hecho,  
sin vosotros no habría llegado aquí.**

## Agradecimientos:

Después de muchos años, por fin, ve la luz esta tesis doctoral. En el camino he contado con la ayuda inestimable de muchas personas. Algunos me han ayudado directamente, otros han estado a mi lado dándome aliento en momentos de desánimo y muchos me han ayudado, sin saberlo, con su amistad y apoyo. A todos los que a continuación nombro y a los que no nombro, gracias.

A todas las mujeres y familias que participaron generosamente en el estudio: gracias por dar un poco de vosotras para ayudar a otros ampliando el conocimiento sobre lactancia.

A Pilar Codoñer y Victoria Valls, mis dos directoras: gracias por vuestro empuje. Sin vuestros conocimientos, capacidad investigadora y paciencia no hubiera salido adelante esta tesis.

A Julia Colomer, por el cariño con que me has ayudado siempre que te lo pedí. A Cintia Borja y Purificación Rodas, compañeras y amigas, por vuestra contribución que tan importante ha sido en este trabajo. A Teresa Carceller, por tu aliento callado y tu amistad. A Juana Cantero, Cristina Barrios y Jazmín Ripoll, por vuestro apoyo sin el que este proyecto no hubiera sido posible.

A Gabriel Abeledo, mi primer maestro en el campo de la pediatría, gracias por todo lo que aprendí de ti en mis primeros años en el camino de la pediatría. A Jaime Dalmau, por haber sido mi "primer maestro" en la ciencia de la nutrición infantil y porque siempre conté con tu apoyo y tu amistad. A Ana Muñoz y Carmen Díaz, por todo lo que a vuestro lado aprendí de lactancia y humanización. A Pepe Cambra, porque me regalaste mi primer libro sobre lactancia materna, abriéndome la puerta a este apasionante campo del conocimiento, pero sobre todo porque de ti aprendí humanidad y mucha pediatría.

A Jesús Martín Calama: gracias por ser el gran impulsor del saber sobre lactancia entre los pediatras españoles y por permitirme caminar a tu lado en tantos proyectos. Gracias por tanta paciencia y por tu empeño en abrir el campo de la investigación sobre lactancia.

A Juan José Lasarte, Adolfo Gómez Papí, Pepa Aguayo y M<sup>a</sup> José Lozano: gracias por compartir vuestra amistad, por todo lo aprendido, vivido, reído y crecido por la lactancia, para la lactancia y gracias a la lactancia. Porque caminar a vuestro lado es un privilegio y hace que el camino sea ligero a pesar de las dificultades.

A Carmen Pallás: gracias por tu aliento, especialmente en los momentos difíciles, por la fuerza y la resiliencia, la humanidad y todo el conocimiento que me has dado y que me impulsas a buscar. A Javier Soriano, porque de ti he aprendido a ser mejor pediatra y mejor persona. A Jose M<sup>a</sup> Paricio, Leonardo Landa, Vicente Molina, Beatriz Flores, Isabel Espiga y a todos con los que, en el comité de lactancia o en la IHAN, he compartido esfuerzos por mejorar la situación de las mujeres que amamantan, gracias por seguir en la brecha.

A la Fundación Fullbright y a mis profesores y compañeras del programa de nutrición de la Escuela de Salud Pública en la Universidad de Berkeley: gracias por proporcionarme las herramientas del conocimiento que tantas puertas me han abierto después.

A Javier Pemán, mi amor y compañero, gracias por creer en mí, por tu apoyo incondicional y por tus correcciones, relecturas y sugerencias que tanto han mejorado este escrito.

A Begoña y Alberto, mis hijos, por ser como sois, por apoyarme tanto, por todo el tiempo que os ha robado este trabajo y porque con vosotros disfruté del gran regalo de la lactancia.

A Plácido y M<sup>a</sup> Teresa mis padres, por vuestro amor, vuestro apoyo y porque siempre sin dudarlo e incondicionalmente estáis a mi lado.

A Begoña y Plácido, mis hermanos, gracias porque aun desde lejos puedo sentirlos siempre cerca. A mis cuñados (y ex cuñada) y a M<sup>a</sup> Nieves, gracias por vuestra comprensión y apoyo.

A Carmen Romeo y Víctor Arenzana: gracias por todo lo que me habéis enseñado y porque a vuestro lado he podido compartir el amor por la ciencia, la curiosidad y el amor a la vida y a la libertad de pensamiento.

A Paco, porque siempre creíste en mí, y porque tu estímulo y acicate continuo no me ha permitido "sentarme al borde del camino y aislar del mundo solo un rincón tranquilo".

A Emilia Cantón y Fernando Sastre, Isabel Lozano y Felipe Pardo, Jorge Ferrando y M<sup>a</sup> Carmen Hernández, Begoña Frades y Joaquín Schmidt, Merche Asuero y Benja Carreras, mis amigos: gracias por vuestra amistad que me ayuda a vivir. Carmen, Moyra, Mercedes y Jesús, ya no estáis pero nunca podré agradecer bastante la fuerza que dejasteis en mi corazón.



## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN .....	14
1. METABOLISMO OXIDATIVO .....	14
A. Antecedentes Históricos.....	14
B. Radicales libres (RL) y Especies reactivas.....	15
C. Oxidación y daño oxidativo.....	21
D. Sistema antioxidante, equilibrio redox y estrés oxidativo.....	23
E. Antioxidantes.....	25
2. ALIMENTACION, APOORTE ANTIOXIDANTE Y SALUD. ....	36
A. Los alimentos: fuente de antioxidantes.....	36
B. Nutrición perinatal y salud.....	40
C. estrés oxidativo neonatal .....	42
D. Alimentación y epigenética.....	45
3. LECHE HUMANA, COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES. ....	46
A. Variaciones en la composición .....	47
B. Componentes de la leche humana.....	48
C. estatus oxidativo de la leche HUMANA.....	61
D. Necesidades nutricionales de la mujer durante la lactancia.....	62
4. PROPIEDADES NUTRITIVAS Y APOORTE ANTIOXIDANTE DE LA CERVEZA. ....	66
A. Breve Historia de la cerveza.....	66
B. Elaboración de la cerveza.....	67
C. Composición y propiedades nutricionales de la cerveza.....	68
D. Composición y propiedades nutricionales de la cerveza sin alcohol. ...	74
E. Consumo de cerveza y salud.....	75
II. JUSTIFICACIÓN. ....	79

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	84
1. HIPÓTESIS.....	84
2. OBJETIVO PRINCIPAL.....	84
3. OBJETIVOS.....	84
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	86
IV. MATERIAL Y MÉTODOS.....	88
1. DISEÑO.....	88
A. Tipo de estudio.....	88
B. Sujetos de estudio.....	88
C. Tamaño muestral.....	90
D. Requerimientos éticos.....	90
E. Seguimiento.....	90
F. Variables.....	93
2. SUPLEMENTO.....	96
3. METODOLOGÍA.....	97
A. Datos dietéticos.....	97
B. Muestras.....	97
C. Métodos de Análisis.....	99
V. RESULTADOS.....	106
1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES.....	107
2. INGESTA MATERNA HABITUAL ESTIMADA.....	109
3. ESTADO OXIDATIVO.....	115
A. Capacidad antioxidante total (CAT) de la leche.....	115

B. Contenido de antioxidantes en la leche materna.....	120
C. Daño oxidativo del lactante. ....	124
<b>VI. DISCUSION.....</b>	<b>134</b>
1. PORQUÉ UN ESTUDIO SOBRE LACTANCIA Y AOX EN LACTANTES SANOS.....	134
2. PORQUÉ ESTUDIAMOS LA DIETA MATERNA.....	135
3. SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA DIETA MATERNA .....	138
4. PORQUÉ ELEGIMOS LA CERVEZA SIN ALCOHOL COMO SUPLEMENTO .....	145
5. SOBRE EL ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE.....	147
6. SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA .....	148
7. SOBRE LAS VARIACIONES DE LA TAC TOTAL DE LA LECHE HUMANA.....	150
8. SOBRE EL CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES DE LA LECHE .....	152
9. SOBRE LA REPARACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO NEONATAL.....	155
10. A MODO DE RESUMEN .....	158
<b>CONCLUSIONES: .....</b>	<b>160</b>
<b>CONCLUSIÓN FINAL .....</b>	<b>163</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>166</b>
<b>ANEXO 1. INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>202</b>
<b>ANEXO 2. INDICE DE TABLAS .....</b>	<b>204</b>
<b>ANEXO 3. MODELO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO .....</b>	<b>206</b>
<b>ANEXO 4. CARTA PARA MADRES Y PADRES .....</b>	<b>209</b>
<b>ANEXO 5. REGISTRO DE 24 HORAS .....</b>	<b>210</b>
<b>ANEXO 6. CARTA AL PEDIATRA.....</b>	<b>211</b>
<b>ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS:.....</b>	<b>212</b>



## I. INTRODUCCIÓN

## I. INTRODUCCION

*“El O<sub>2</sub> es venenoso; los seres vivos aerobios sobreviven en él gracias a que han desarrollado sistemas de defensa antioxidante” (Halliwell, 2007)*

*“Human milk is uniquely superior for infant feeding and is species-specific; all substitute feeding options differ markedly from it. The breastfed infant is the reference or normative model against which all alternative feeding methods must be measured with regard to growth, health, development, and all other short and long-term benefits.” (Academia Americana de Pediatría, 2005)*

## I. INTRODUCCIÓN

### 1. METABOLISMO OXIDATIVO

#### A. ANTECEDENTES HISTÓRICOS.

La toxicidad del oxígeno (O<sub>2</sub>) fue descrita por Priestley y Scheele en 1771; Paul Bert refirió las convulsiones por O<sub>2</sub> en 1878 y, en 1899, Lorraine-Smith observó la afectación pulmonar en animales tras la exposición a elevadas concentraciones de O<sub>2</sub> (Viqueira, 2008). El papel tóxico del O<sub>2</sub> en la génesis de la retinopatía del prematuro fue nombrado por Campbell en 1951 (Tin, 2007) y en 1969, Lemos publicó la toxicidad en relación con la broncodisplasia del recién nacido pretérmino (DeLemos, 1969).

Tras el artículo en Nature de 1954 sobre los radicales libres (RL) de Commoner, Townsend y Pake (Commoner, 1961), Harman describe el daño oxidativo y sus consecuencias sobre el organismo en 1956 (Harman, 1981) y, posteriormente, se descubren los efectos del daño oxidativo a proteínas, lípidos o ADN. Unos años después empiezan a caracterizarse los RL y sus funciones en el metabolismo (Mittal, 1977). Posteriormente se descubre el importante papel del óxido nítrico (NO) en la vasodilatación (Radomski, 1987; Culotta, 1992).

## I. INTRODUCCION

La “regulación oxidativa” es, desde hace años, un campo de permanente interés para la ciencia básica y la aplicada (Dröge, 2002) así como el estudio de los RL y su rol en la génesis de las enfermedades crónicas como la obesidad (Codoñer, 2014), la arterioesclerosis o el cáncer (Burton, 2011; Fewtrell, 2011).

### B. RADICALES LIBRES (RL) Y ESPECIES REACTIVAS.

Los RL se definieron inicialmente como estructuras químicas capaces de existencia independiente que, por contener un electrón sin emparejar en el orbital más externo de su molécula, son inestables y muy reactivas. Buscando el equilibrio intercambian electrones con las moléculas de su entorno y provocan, como resultado, la aparición de nuevas moléculas oxidadas. Estas, a su vez, al donar o perder un electrón en su capa más externa pueden transformarse en nuevos RL. Se desata así una reacción en cadena donde cada nuevo RL le roba un electrón a otra molécula. Este daño puede extenderse indefinidamente dando origen al llamado “estrés oxidativo” (Betteridge, 2000).

El nombre genérico: “especies reactivas” incluye distintas moléculas con poder oxidante, derivadas de oxígeno y de nitrógeno. Los **derivados del O<sub>2</sub>** (especies reactivas de oxígeno o **ROS**) como el superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), el hidroxil (OH<sup>•</sup>) o el peróxido (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y los **derivados del nitrógeno** (las especies reactivas del nitrógeno (**NOS**) como el peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) o el óxido nítrico (NO), son algunas de ellas (Tabla I-1).

Tanto las ROS como los NOS incluyen moléculas radicales y moléculas no radicales (Halliwell, 1996, Halliwell, 2012). Otras moléculas como los derivados del hidrógeno, azufre o cloro, pueden contribuir también a la propagación y mantenimiento de reacciones de oxidación en cadena.

## I. INTRODUCCION

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

### a. Radicales libres más relevantes

El radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) es muy reactivo, tiene una vida media muy corta ( $10^{-9}s$ ) y es capaz de interaccionar con todas las biomoléculas cercanas (Pastor, 2000). Se produce por la acción de las radiaciones UV, X o gamma en reacciones químicas y su acción es catalizada por el cobre y el hierro (Halliwell, 2007).

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

El Oxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) no es muy reactivo, tiene una vida media de 3 a 5 segundos y se produce durante la conversión de la L-argininina a L-citrulina. Esta reacción que es catalizada por la óxido-nítrico-sintetasa, es NADPH y oxígeno dependiente y tiene lugar en las mitocondrias de diversos tejidos (endotelial, nervioso, muscular y epitelios) (Li, 2005; Nisoli, 2003). El NO posee múltiples funciones y puede regular la fisiología, tanto en procesos agudos como a largo plazo, e inducir cambios celulares cuasi permanentes. La importancia de este radical deriva de su participación en reacciones críticas para el organismo, así como de sus

## I. INTRODUCCION

dobles propiedades, ya que, en determinadas condiciones, puede actuar como antiinflamatorio a concentraciones bajas y como pro inflamatorio cuando se encuentra en concentraciones elevadas (Grisham, 1999). El NO es precursor de compuestos muy activos como el peroxinitrito o el dióxido de nitrógeno que participan en procesos de lipoperoxidación de membranas y lipoproteínas. Pero también puede limitar la propagación de reacciones de oxidación lipídica con la formación de productos no radicales como los nitrosolípidos. Y es capaz de modular la respiración mitocondrial inhibiendo la citocromo C oxidasa, aumentar o disminuir el flujo sanguíneo y regular la unión del O<sub>2</sub> a la hemoglobina (Sansbury, 2014). Que actúe como pro oxidante (promoviendo la disfunción tisular y celular con efectos pro inflamatorios) o como antioxidante (con propiedades reguladoras y antiinflamatorias) depende de su concentración, de la velocidad relativa de su formación, de la presencia de otros radicales y del lugar de formación (Rubbo, 1998). En concentraciones bajas, el NO desarrolla importantes acciones reguladoras y antiinflamatorias. En concentraciones elevadas y en presencia de determinados metales de transición es capaz de provocar inactivación enzimática y daños al ADN (capaz de provocar mutaciones y roturas) (Drögge, 2002).

El **dióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>•)** que es producido en la reacción del óxido nítrico con el O<sub>2</sub> y en la descomposición del peroxinitrito (Postlethwait, 1995), es un radical muy activo, capaz de iniciar la peroxidación lipídica (Kaur, 1994).

El **radical peroxilo (ROO•)** deriva de la reacción del O<sub>2</sub> con los radicales hidrocarbonados lipídicos principalmente (Reed, 1987), es probablemente el radical más abundante y tiene una vida media de segundos (Cadenas, 1989).

### b. Especies reactivas, no radicales

El **Peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)** es generado tras la dismutación del ión peróxido, la reducción de la molécula de O<sub>2</sub>, o como subproducto de determinadas acciones enzimáticas (glucosa oxidasa, mono amino oxidasa,...)(Nicotra, 2004). No puede ser considerado un radical libre porque no tiene electrones desapareados

## I. INTRODUCCION

en su orbital más externo, pero tiene gran facilidad de difusión a través de las membranas y es capaz de producir oxidación en zonas muy alejadas de su lugar de producción.

El **Oxígeno singlete**  $^1\text{O}_2$ , es una forma excitada del oxígeno molecular que se forma por efecto de la luz solar sobre algunas moléculas y como subproducto de diversas reacciones enzimáticas en el organismo. Reacciona con facilidad con otras moléculas, es de vida media muy corta ( $10^{-6}$  s) y oxida lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. (Ryter, 1998)

El **Peroxinitrito** ( $\text{ONOO}^-$ ) es el resultado de la unión de anión superóxido y óxido nítrico (Miles, 1996). Es un potente intermediario oxidante capaz de inducir la peroxidación de lípidos y de degradar carbohidratos, oxidar lípidos, tioles y tioéteres y nitrar la guanosina o los residuos de tirosina fragmentando la cadena del ADN (Beckman, 1996).

### c. Generación de radicales y especies reactivas.

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

#### Fuentes endógenas

La generación endógena de RL es consecuencia del metabolismo oxidativo. En este ocurren diversas reacciones, enzimáticas y no enzimáticas, necesarias para la vida y en las que el organismo produce moléculas reactivas (que pueden o no ser RL) como subproductos.

La cadena de respiración celular o de transporte electrónico mitocondrial, es la principal fuente de generación de ROS en las células (Alfadda, 2012). El 95% del  $\text{O}_2$  procedente de la respiración es utilizado para generar energía por la acción de la citocromo-C-oxidasa durante la formación de ATP. Sin embargo, como resultado de reacciones en el complejo I de la cadena respiratoria o en el complejo

## I. INTRODUCCION

quinona-semiquinona-ubiquinol (CoQ10), un 5% de este  $O_2$  es reducido a la forma monovalente, el radical superóxido (Ames, 1993). Además, un índice de reducción elevado de los transportadores de la cadena respiratoria de la membrana interior de la mitocondria, ocasiona un exceso de generación de radical superóxido, cuya dismutación da lugar a la aparición de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) mitocondrial (Boveris, 1975; Turrens, 1980).

Los RLs también son generados en la cadena de transporte de electrones no fosforilante ( $NADP \rightarrow NADPH$ ) en la que participa activamente el citocromo P450. Durante las reacciones de hidroxilación y desaturación se produce un continuo intercambio de electrones y, como resultado del mismo, producen pequeñas cantidades de ión superóxido (Sevanian, 1990).

Los RL también pueden resultar como excedentes de reacciones mediadas por enzimas como la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa o la óxido nítrico sintetasa (Alfadda, 2012). Esta última enzima es la responsable de la formación de óxido nítrico (NO) en diversos tejidos, es dependiente de NADPH y  $O_2$ , cataliza la oxidación de L-arginina a L-citrulina y produce NO en el proceso. Existen 3 isoformas que se distinguen por su lugar de acción (Sansbury, 2014). En el interior de las células fagocíticas, esta enzima cataliza la síntesis de  $NO^\bullet$  que permite la formación de  $ONOO^-$  (por unión de  $O_2^{\bullet-}$  y  $NO^\bullet$ ) y que es un potente agente de peroxidación lipídica capaz de lisar células dañados y microorganismos bacterianos (Nathan, 1994). Durante la acción de otras enzimas como la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa para la producción de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos también se generan RL (Mancuso, 2007).

También se producen RLs, durante la fagocitosis, cuando en el interior de la membrana de neutrófilos, monocitos y macrófagos se activa la NADPH oxidasa y se generan  $O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  para combatir a los microorganismos (Weiss, 1982). De modo similar se originan RLs en otros procesos biológicos como la síntesis de prostaglandinas o en el sistema del citocromo P450.

### Fuentes exógenas

## I. INTRODUCCION

Además de la generación endógena, el organismo está expuesto a fuentes exógenas de RL procedentes del medioambiente, la alimentación y los xenobióticos. Un ejemplo es la formación no enzimática de radicales por efecto de agentes de la acción de las **radiaciones ionizantes** sobre los compuestos orgánicos. (Riley, 1994; Lobo, 2010), como durante la hidrólisis de la molécula de agua por la acción de las radiaciones gamma, en la que se generan radicales hidroxilo que pueden alterar el ADN (Betteridge, 2000; Tulard, 2003).

También los **xenobióticos** (compuestos químicos ajenos a la composición de los organismos vivos) son capaces de producir daño celular por generación de ROS. En este grupo están incluidos los pesticidas, los contaminantes aéreos, los hidrocarburos aromáticos, algunos medicamentos y muchas drogas (humo del tabaco). Los más tóxicos son los compuestos organoclorados, los iones metálicos, los barbitúricos y las antraciclinas (Valls, 2006; Valls 2008). La mayoría de estos contienen cadenas alquílicas, anillos aromáticos o halógenos que por ser, en su mayoría lipofílicos, atraviesan las membranas con facilidad. Sin embargo, son excretados a baja velocidad por lo que suelen acumularse en el organismo y para su eliminación son necesarias reacciones de hidrólisis y oxidación y en estas se liberan gran cantidad de RLs (Cadenas, 2000).

El **O<sub>2</sub>** utilizado con fines medicamentosos, como por ejemplo para la ventilación asistida o la reanimación neonatal, puede inducir daños pulmonares por exceso de producción de ROS (Davis, 2004; Saugstad, 2006). Al interactuar con determinadas moléculas en el citoplasma, el O<sub>2</sub> origina especies oxigénicas reactivas, como el anión superóxido, que por dismutación espontánea o enzimática pueden generar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con elevado poder oxidativo.

Los agentes infecciosos también provocan reacciones inflamatorias y defensivas en las que se producen gran cantidad de RLs (Alfadda, 2012).

Por otra parte, determinadas prácticas alimentarias pueden ser causa de producción excesiva de RLs. Así las ingesta elevadas de calorías, de lípidos, de hidratos de carbono o de proteínas, exigen al organismo excesos de metabolismo oxidativo como la autooxidación de gliceraldehído, la activación de la protein-

## I. INTRODUCCION

kinasa (PK), la glicación, la producción de metil-glioxal y sorbitol, la activación de la fosforilación oxidativa o la activación de la vía de la hexosamina, entre otros (Alfadda, 2012).

El exceso de hierro también se ha asociado a un aumento de riesgo de enfermedades cardiovasculares probablemente porque promueve la formación de RL y  $H_2O_2$  (Hunnicuttt, 2014).

Por otra parte, el aporte excesivo de un antioxidante aislado en forma de suplementos, puede tener un efecto paradójico, cuando la molécula de antioxidante pasa a comportarse como un "pro-oxidante" lo que da lugar a un efecto contrario al deseado al provocar un aumento de oxidación (Ommen, 2007; Herrera, 2009).

### C. OXIDACIÓN Y DAÑO OXIDATIVO.

El metabolismo oxidativo es, para los seres de vida aerobia, la base de procesos fisiológicos indispensables como la respiración celular, la fagocitosis, el transporte de moléculas a través de la membrana, la acción enzimática o los procesos biogénicos. Este metabolismo al utilizar el  $O_2$  como aceptor final de electrones posee una elevada eficiencia energética, pero como resultado de algunas de las reacciones de oxidación, consustanciales a la vida aerobia, se generan sustancias potencialmente tóxicas y muy reactivas: los RLs.

Aunque los RLs pueden oxidar cualquier tipo de biomolécula, los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas son sus principales dianas (Young, 2001). La agresión oxidativa resulta en la desnaturalización de estas moléculas y puede conducir a la alteración de funciones de la membrana celular (por peroxidación de los fosfolípidos), del citoplasma (desnaturalización de las proteínas), del sistema mitocondrial (sistemas enzimáticos o el ARN) o del mismo núcleo (ADN).

Los avances en el conocimiento del metabolismo oxidativo han permitido demostrar que el envejecimiento celular y muchas enfermedades crónicas (enfermedades autoinmunes, aterosclerosis, cáncer, hipercolesterolemia, diabetes,

## I. INTRODUCCION

Alzheimer, fibrosis quística, cataratas y artritis reumatoides, entre otras) tienen relación directa o indirecta con el daño oxidativo (Stadtman, 1997; Sasabe, 2014).

La oxidación **lipídica o peroxidación** se produce por la oxidación de los dobles enlaces presentes en la molécula de los ácidos grasos. Se producen así, radicales alquilo y peróxidos capaces a su vez de oxidar proteínas y otras moléculas de ácidos grasos. La peroxidación lipídica puede ser especialmente dañina cuando afecta a los lípidos de las membranas celulares. En estas, los lípidos se encuentran formando matrices complejas con carbohidratos y proteínas, por lo que las reacciones de oxidación se pueden propagar en cadena a las moléculas adyacentes (Vladimirov, 1986) de la membrana, o atravesarla y extenderse a las moléculas intracelulares (en citoplasma o núcleo). La peroxidación de los lípidos de la membrana celular puede alterar su conductividad, su permeabilidad o su fluidez. Este daño, puede ser fácilmente reparable o resultar en una alteración permanente que aumente la susceptibilidad a ulteriores daños oxidativos (Yu, 2005; Pamplona, 2008). Por otra parte, la oxidación lipídica está estrechamente relacionada con la oxidación de algunas proteínas como las apolipoproteínas, y esto tiene importantes consecuencias para la génesis de enfermedades como la arterioesclerosis (Alfadda, 2012). La peroxidación lipídica "in vivo" ha sido implicada en la enfermedad cardiovascular, el cáncer, las alteraciones neurológicas y el envejecimiento (Kivatinix, 2012). La oxidación del colesterol produce hidroperóxidos, oxisteroles y otros productos implicados en la génesis de la placa de ateroma (Yoshida, 2010).

La **oxidación del grupo carbonilo de las proteínas** induce transformaciones de la estructura terciaria o cuaternaria y puede alterar su función (Cheal, 2009). No todas las proteínas son igualmente susceptibles a la oxidación. Por ejemplo, un mayor contenido en metionina o cisteína (que son más sensibles a la oxidación) y determinados tipos de estructura terciaria aumentan la susceptibilidad a la oxidación (Stadtman, 2003).

La **oxidación de los hidratos de carbono** causa la despolimerización de polisacáridos y altera la actividad de interleuquinas, prostaglandinas, hormonas y neurotransmisores (Duan, 2011).

## I. INTRODUCCION

La **oxidación del ADN** se produce cuando la cadena de oxidación llega al interior del núcleo y está relacionada con procesos de mutagénesis y carcinogénesis (Kryston, 2011). La oxidación de un residuo de desoxirribosa en una de las cadenas de la doble hélice, puede provocar la rotura de la cadena. Si la reparación se produce con rapidez, el daño será reversible ya que la otra cadena mantendría íntegra la unión de la doble hélice del ADN por encima y debajo de la rotura, mientras esta es reparada (Breen, 1995). Pero si el RL oxida una base del ADN (purínica o pirimidínica) dando lugar por ejemplo a 8-OH-deoxi-guanosina, 8-OH-adenina, 5-OH-citosina, los daños causados pueden ser más duraderos y graves.

### D. SISTEMA ANTIOXIDANTE, EQUILIBRIO REDOX Y ESTRÉS OXIDATIVO

Tras su descubrimiento, los RLs fueron considerados como moléculas nocivas cuyos efectos debían ser neutralizados por su condición inestable y su alta reactividad. Hoy, varias décadas después, se sabe que en concentraciones controladas, los RLs son necesarios y el organismo los utiliza como mediadores, como segundos mensajeros, como marcadores de daño celular, en la defensa antibacteriana y antivírica, en procesos de defensa inmunitaria, como activadores de procesos celulares, para la regulación del tono vascular, la detección y adaptación a la hipoxia, en la respuesta al estrés oxidativo, o como señalizadores y moduladores de la expresión génica (Drögge, 2002; Jackson, 2002; Liu, 2003; Park, 2011).

El medio, el proceso o la concentración son algunos de los factores que determinan si la presencia de RL resultará en beneficio o daño (Alfadda 2012; Jackson 2002). Por ejemplo, en los procesos de muerte celular por necrosis, un exceso de ROS puede ser perjudicial durante los procesos secundarios de isquemia y revascularización, mientras que en la muerte celular por apoptosis, los ROS adquieren función de marcador celular (Sansbury, 2014).

Un organismo aerobio sano, mantiene una producción de RLs equilibrada con su defensa antioxidante, aunque este equilibrio no es perfecto y continuamente ocurre algún grado de daño oxidativo. Según algunos autores porque

## I. INTRODUCCION

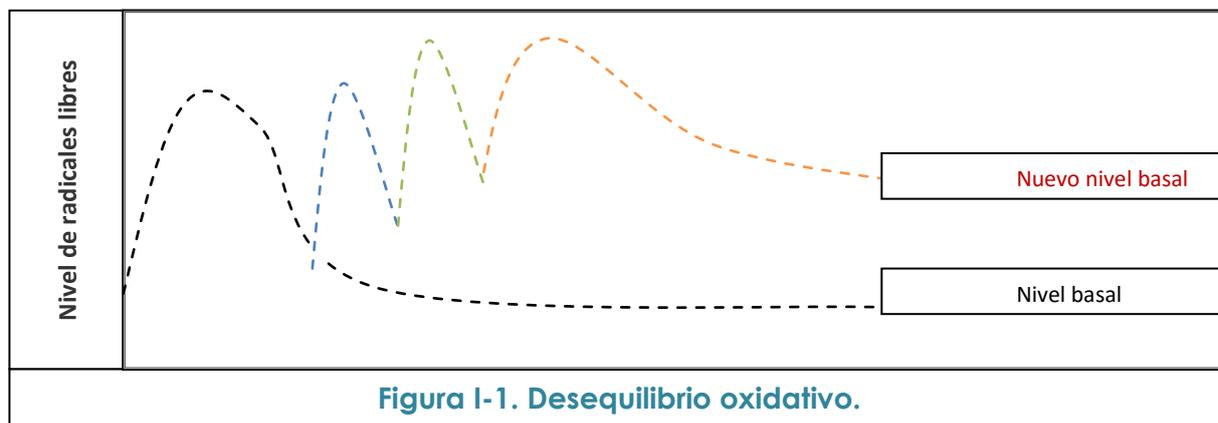
energéticamente es más eficiente reparar los daños que evitar al máximo la oxidación (Halliwell, 2012), pero posiblemente también porque en algunas ocasiones se producen RLs cuya producción y diseminación es prácticamente imposible de interceptar (por ejemplo en la producción del  $\text{OH}\cdot$  por la fisis del  $\text{H}_2\text{O}$  celular tras la acción de radiaciones ionizantes) (Pomposiello, 2002; Nathan, 2003; Cho, 2004; Temple, 2005; Rhee, 2005; Von Sontang, 2006).

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

Se habla de situación de "estrés oxidativo" al desequilibrio metabólico resultante de un nivel de de sustancias oxidadas o pro-oxidantes que supera al de antioxidantes (Sies, 1997). Este estrés puede ser causado por un exceso de producción endógena, por sobrecarga exógena o por déficit de reservas antioxidantes, pero inmediatamente, el organismo intentará alcanzar de nuevo el "equilibrio REDOX" (Drögge, 2002; Urbina-Bonilla 2008) poniendo en marcha los mecanismos antioxidantes descritos previamente. En cualquier caso si el aumento de RL es transitorio o no excesivo, los sistemas antioxidantes serán capaces de devolver el equilibrio al nivel basal. Si por el contrario, la producción de RLs es excesiva o muy mantenida, las reservas resultan insuficientes o no hay una

## I. INTRODUCCION

reposición adecuada, el sistema puede agotarse y entonces se generaría un nivel de equilibrio nuevo, donde las concentraciones basales de RLs serán más elevadas (Figura I-1).



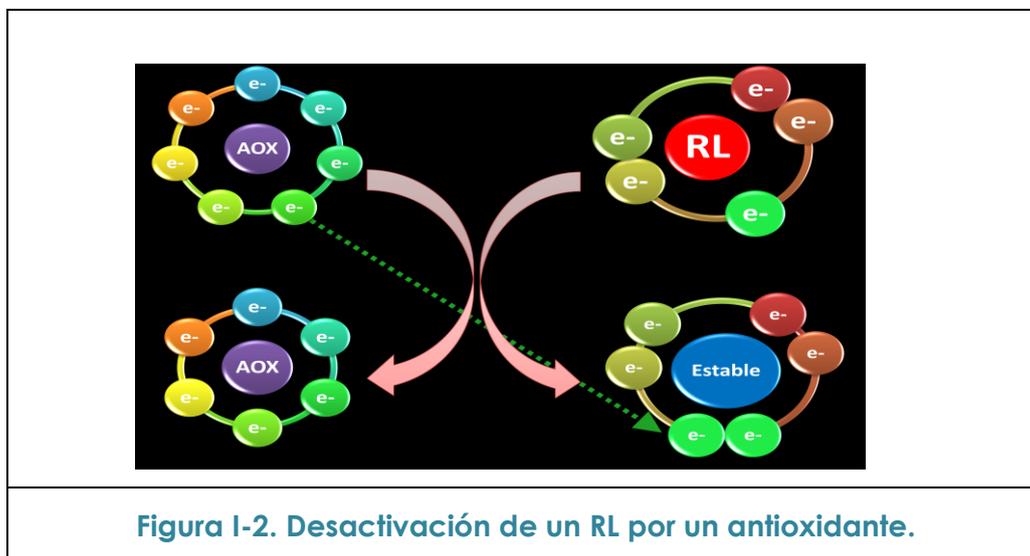
Aunque la investigación sobre el equilibrio REDOX, cómo mantenerlo y cómo prevenir su alteración ha logrado muchas respuestas, desde las primeras definiciones de Halliwell, siguen existiendo grandes incógnitas, que precisan ser despejadas como por ejemplo, sobre el aporte idóneo de antioxidantes o las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

## E. ANTIOXIDANTES

Se conoce como antioxidante a aquel compuesto capaz de aceptar o donar un electrón a los RLs mientras conserva su estabilidad y por tanto no se transforma en una molécula reactiva al perder dicho electrón (Figura I-2). Esto les otorga la capacidad de frenar la cadena de oxidación. Fueron definidos inicialmente por Halliwell y Gutteridge (Halliwell, 2007) como *“sustancias que a bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable son capaces de retrasar significativamente o evitar la oxidación del mismo”*. Sin embargo, esta definición original fue simplificada posteriormente para ajustarla al conocimiento como: *“cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo sufrido por*

## I. INTRODUCCION

una molécula diana" (Halliwell, 2007). También, en palabras del propio Halliwell: "No existe un antioxidante mejor que otros, seguramente el mejor antioxidante sea "la minimización de la exposición al O<sub>2</sub>" (Halliwell, 2000).



Los antioxidantes han sido clasificados en base a: su medio de actuación (de fase lipídica o de fase acuosa); su función (secuestrantes, reparadores, enzimáticos); su composición (proteínas, vitaminas, oligoelementos); su origen (endógenos, exógenos) o su modo de acción (primaria, secundaria, terciaria).

Los **antioxidantes de fase lipídica** (Tabla I-2) actúan fundamentalmente sobre la membrana y los de **fase acuosa** en el medio extracelular y en el plasma (Tabla I-3)

Tabla I-2. Antioxidantes de fase lipídica		
	Acción	Observaciones
<b>Vitamina E (tocoferoles)</b>	Estabiliza membranas. Previene peroxidación lipídica. Barre radicales peroxilo.	Puede ser regenerada por ascorbato, urato o glutatión reducido.
<b>Vitamina A (carotenoides)</b>	Previene la peroxidación lipídica. Barre radicales peroxilo y oxígeno singlete.	En niveles excesivos puede actuar como prooxidante.

## I. INTRODUCCION

<b>Ubiquinol-10 (coenzima Q reducida)</b>	Previene oxidación DNA y lípidos de membrana	Forma parte de la cadena respiratoria en la mitocondria.
---	--	--

<b>Tabla I-3. Antioxidantes de fase acuosa</b>		
	Acción	Observaciones
<b>Vitamina C</b> (ácido ascórbico)	Barre $O_2^-$ , $H_2O_2$ , $OH^-$ , radicales peroxilo, oxígeno singlete y ácido hipocloroso (producto de la actividad fagocítica) Cofactor de enzimas con actividad hidroxilasa.	Es, cualitativamente el antioxidante de cadena más importante. Es regenerado por el glutatión reducido y por la tioredoxina reductasa.
<b>Ácido úrico</b>	Forma complejos estables con el hierro. Protege frente al ozono.	Al reaccionar con radicales libres se convierte en alantoína.
<b>Proteínas</b>	Los grupos sulfhidrilo (tiol) de las proteínas donan un electrón para neutralizar radicales libres. La albúmina une iones cobre y neutraliza ácido hipocloroso. La haptoglobina une la hemoglobina plasmática libre previniendo su auto-oxidación.	Ferritina: une iones hierro y oxígeno. Tranferrina: fija el hierro libre. Lactoferrina: se une al hierro y cobre libres. Ceruloplasmina: liga el cobre libre.

Algunos antioxidantes son micronutrientes como las **vitaminas** pero también hay **proteínas** fijadoras de hierro y cobre, cuya acción antioxidante radica en la capacidad de unir y fijar estos metales que son fundamentales en muchas reacciones metabólicas de oxidación.

Entre los antioxidantes **endógenos** se cuentan enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la glutatión reductasa (Gr) o las tioredoxinas (TOx) que catalizan la transformación de los RLs en compuestos menos reactivos (Tabla I-4). También son endógenos otros compuestos no enzimáticos como el glutatión, la N-acetilcisteína, la tioprolina, la taurina, el ácido úrico o las proteínas fijadoras de metales.

Se denomina antioxidantes **exógenos** a aquellos que como la vitamina A, C y E, el ácido fólico y los polifenoles no pueden ser sintetizados por el organismo y necesitan ser aportados con la alimentación (Lobo, 2010).

## I. INTRODUCCION

Tabla I-4. Enzimas antioxidantes		
Enzimas	Reacción	Observaciones
<b>Superoxido dismutasa (SOD)</b>	Dismutación de $O_2^-$ a $H_2O_2$ .	<b>CuZn SOD:</b> Espacio inter membrana mitocondrial, citosol y núcleo. <b>Mn SOD:</b> Matriz mitocondrial. Es la isoforma funcionalmente más importante. <b>Extracelular:</b> Producida por fibroblastos y células endoteliales.
<b>Catalasa</b>	$H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$	Presente en todos los tejidos.
<b>Glutation Peroxidasa</b>	Reduce los hidroperóxidos.	Presente en plasma, citoplasma y mitocondrias.
<b>Glutation reductasa</b>	Reduce el GSSH a GSH.	En la cadena respiratoria
<b>Tiorredoxinas</b>	Reducción de uniones disulfuro.	Extra e intracelulares, existen varias isoformas con selenocisteína en su centro activo.

Otras moléculas son consideradas parte del sistema antioxidante por ser necesarios para el correcto funcionamiento del resto de sistemas (por ejemplo el Cu, el ZN o el Mn, para la CuZn- y la Mn-superóxido dismutasa) o por su capacidad para regenerar moléculas antioxidantes.

Se entiende por **capacidad antioxidante total (CAT)** de un medio o líquido corporal (por ejemplo el plasma o la leche materna) la capacidad del mismo para detener una reacción oxidativa. Al medir la CAT se mide el resultado de la acción sinérgica de diversas sustancias antioxidantes. No existe un método único para medirla y a lo largo del tiempo se han ido describiendo y utilizando distintos métodos de laboratorio para determinar esta capacidad en nuestro organismo y los diferentes líquidos corporales.

Otro modo de clasificar los antioxidantes, consiste en hacerlo de modo similar a las acciones preventivas. Los antioxidantes de **acción primaria** que previenen la formación de radicales detoxificándolos (catalasa, glutacion peroxidasa o superóxido dismutasa); de **acción secundaria** que entran en acción ante una concentración excesiva de RL y previenen la propagación en cadena (glutacion, tocoferoles, ácido ascórbico o carotenoides) (Finaud, 2006) y los de **acción terciaria**, los que reparan el daño molecular o retiran los productos dañados

## I. INTRODUCCION

(proteasas, fosfolipasas o reductasas) (Sartori, 2003; Mataix, 2002) y los sistemas reparadores de ADN y ARN (Jena, 2012).

### Algunos antioxidantes endógenos

El **Glutation** es una molécula compuesta por 3 péptidos: ácido glutámico, cisteína y glicina (gamma-glutamil-cisteinil-glicina). Es sintetizado en el hígado y se considera la molécula antioxidante de origen endógeno más importante. El grupo tiol reducido de la cisteína (-SH) le confiere una gran capacidad como antioxidante; el glutatión oxidado: GSSG resulta de la unión de 2 moléculas de glutatión (GSH) por medio de un puente disulfuro. La disponibilidad de cisteína limita la producción de glutatión. El glutatión participa en la síntesis de ADN, en la detoxificación de xenobióticos y actúa como antioxidante estabilizando radicales como hidroxilo, superóxido y peróxidos, directamente o a través de la glutatión peroxidasa (Sies, 1999) siendo para algunos autores, el equilibrio entre GSH y GSSG, el principal determinante del estado oxidativo del organismo humano (Wally, 2012).

La **Coenzima Q10 (CoQ10)** (2,3-dimetoxi-5-metil-6-decaprenil-1,4-benzoquinona) o ubiquinona es un compuesto lipídico esencial que forma parte de la cadena respiratoria de las mitocondrias (Bentinger, 2003). 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. La CoQ10 es considerada como el antioxidante lipofílico más importante, de síntesis endógena y su potencia antioxidante es muy superior a la de muchos otros (Valls, 2004; Bentinger, 2007).

La **lactoferrina** es una proteína constituida por una única cadena y en su estado natural está parcialmente saturada. En su forma saturada es muy resistente a la proteólisis. Su acción 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 molécula (Ronayne, 2000). En el interior del

## I. INTRODUCCION

núcleo es capaz de bloquear el factor de transcripción NF- $\kappa$ B inhibiendo la producción y suelta de citoquinas (IL-1, IL2, IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$ ) y de algunos mediadores inflamatorios como el NO y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos o de prostaglandinas (PGE1 y PGE2), limitando así la producción de radicales libres como el ión superóxido. (Hanson, 2007; Lonnerdal, 2010).

Las **enzimas antioxidantes** poseen diferentes funciones: desde el “secuestro” y desactivación de los RL, ROS o NOS a la regeneración de otros antioxidantes. Catalizan diversas reacciones por las que desactivan RLs, recuperan moléculas oxidadas, colaboran en la desactivación de xenobióticos, y reparan daños y regeneran otras moléculas antioxidantes (L’Abbe, 2000). La SOD dependiente de magnesio cataliza la transformación del  $O_2^{\cdot-}$  en peróxido de hidrógeno que luego será desactivado por otras enzimas como la catalasa o la glutatión peroxidasa (Fridovich, 1997). Así disminuye la carga de  $O_2^{\cdot-}$  generado en la cadena respiratoria de las mitocondrias y se evita la inutilización de las deshidratasas. Según su localización se han identificado, al menos 3 variantes (Zelko, 2002). La catalasa cataliza la desactivación del  $H_2O_2$  en agua y  $O_2$  (Fig. 1.18) (Chance, 1979), precisa para su actividad de  $Fe^{3+}$  y se localiza fundamentalmente en los peroxisomas (Tolbert, 1981). La glutatión peroxidasa (GPx) cataliza la oxidación del glutatión reducido y con ello participa en la recuperación de moléculas oxidadas como el alfa-tocoferol oxidado, lípidos (Aamen, 2004; Sener, 2005) o ADN (Masella, 2005). Es esencial para conservar la integridad y función de las membranas, siendo capaz de detoxificar los peróxidos lipídicos y el peróxido de hidrógeno hasta agua en el interior del citoplasma y de la mitocondria (McCord, 2000). Se han identificado 2 tipos diferentes y 8 isoenzimas diferentes (Styskal, 2012).

Las **tioredoxinas** tienen un papel antioxidante esencial en el citoplasma y la mitocondria, disminuyen la carga de ROS al reducir los disulfitos en los grupos tiol y mantiene otras proteínas en su estado reducido. Tras ser oxidadas son regeneradas por la tioredoxina reductasa que usa el NADPH como donante de electrones. Además forman parte de los redoxisomas que regulan la señalización celular lo que

## I. INTRODUCCION

las relaciona con la génesis de diversas enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes y diabetes (Yoshihara, 2013).

### Algunos antioxidantes exógenos

La **vitamina E** comprende un grupo de moléculas liposolubles entre las que hay tocoferoles y tocotrienoles que están presentes asociadas a los lípidos en membranas y plasma. Se les considera el antioxidante natural más potente y son especialmente importantes en la protección de la integridad de las membranas por su actividad de control de las reacciones de lipoperoxidación. Compuesta principalmente por  $\alpha$  y  $\gamma$ -tocoferol es capaz de desactivar los radicales  $^1O_2$ ,  $O_2^{\bullet-}$ ,  $OH^{\bullet}$  y  $ROO^{\bullet}$ . Al unirse con los RLs se oxida dando lugar a tocoferoxilos que son reducidos de nuevo a tocoferol por la acción del ácido ascórbico, el ubiquinol o el GSH (Brigelius-Flohé, 1999; Abudu, 2004). En ausencia de estas moléculas, también denominadas "co-antioxidantes", 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) (Kontush 1996).

La **vitamina C (vit C) o ácido ascórbico** es un potente antioxidante hidrosoluble presente en concentraciones elevadas en plasma y medios tisulares (tanto en el citosol como en el medio extracelular) (Silencio, 2013). Es necesaria para regenerar el  $\alpha$ -tocoferol oxidado (el radical tocoferil) y es capaz de reaccionar con numerosos RL ( $O_2^{\bullet-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO^{\bullet}$ ,  $OH^{\bullet}$  y  $^1O_2$ ). 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 (Dhremmer, 2001). En presencia de metales de transición oxidados como el  $Fe^{2+}$  o el  $Cu^{2+}$  la vitamina C puede actuar como pro oxidante (Du, 2012). Dentro del organismo su concentración es máxima en los órganos y tejidos con mayor actividad metabólica: glándulas suprarrenales, hígado, páncreas, cerebro, ojos o hipófisis (Rumsey, 1998). Esta vitamina ejerce múltiples acciones antioxidantes como la inactivación de

## I. INTRODUCCION

radicales libres en medios acuosos, la protección del tejido nervioso, la protección de la acción y de la estructura de los fagocitos y el mantenimiento del hierro en su forma estable: la ferritina (Romeu, 2006).

Los **carotenoides** son moléculas de hidrocarburo poliénico (tetrapenoides (C<sub>40</sub>)) que pueden contener hasta 15 dobles enlaces en su molécula. Se han aislado más de 600 moléculas diferentes. Se subdividen en **carotenos** ( $\alpha$ - y  $\beta$ -carotenos y licopenos) que no contienen O<sub>2</sub> en su molécula y **xantofilas que** son carotenoides oxigenados con grupos carboxilos e hidroxilos (criptoxantina, cantaxantina y luteína) (Lobo, 2012). Los carotenos son los precursores de vitamina A o retinol y el más activo y cuantitativamente más importante es el  $\beta$ -caroteno (Azeredo, 2008). La luteína, la zeaxantina, la criptoxantina, el licopeno y los  $\beta$ - y  $\alpha$ -carotenos constituyen el 90% de los carotenoides circulantes en el ser humano (Khachick, 1997). La importancia de la acción antioxidante de los carotenoides se debe principalmente a su riqueza en dobles enlaces lo que les permite gran capacidad de control de RLs. 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 (Stahl, 1993; Olson, 1995). Estos antioxidantes son especialmente importantes en la prevención de la peroxidación lipídica y modulan los niveles de otros antioxidantes contribuyendo a su regeneración (Bohm, 2012). Por ejemplo la acción sinérgica con el  $\alpha$ -tocoferol aumenta la actividad antioxidante del  $\beta$ -caroteno, al inhibir los efectos oxidantes del  $\beta$ -caroteno-peroxilo y protegerlo de la autooxidación (Bohm, 2012). Estos compuestos pueden actuar como antioxidantes o como pro oxidantes en función de la concentración parcial de O<sub>2</sub> en el medio y de la disponibilidad de otros antioxidantes que como la vitamina C reduzca los compuestos oxidados (Young and Woodside, 2001). Si la PpO<sub>2</sub> es baja, actúan como antioxidantes, pero pueden perder su capacidad antioxidante en presencia de PpO<sub>2</sub> elevada (Young and Lowe, 2001).

Los **polifenoles** son derivados benzo- $\gamma$ -piranos y se subdividen en clases según su grado de oxidación (Figura I-3 (Román, 2007)) Dentro de este grupo los que poseen mayor capacidad antioxidante son los flavonoides. Se conocen, en la

## I. INTRODUCCION

actualidad, más de 5.000 flavonoides diferentes (Beecher, 2003) que se agrupan en familias como las flavonas, las isoflavonas, las flavanonas, los flavanoles, flavonoles y las procianidinas. Se encuentran en formas simples o polimerizadas pudiendo llegar a pesar 30.000 Daltons (Bravo, 1998).

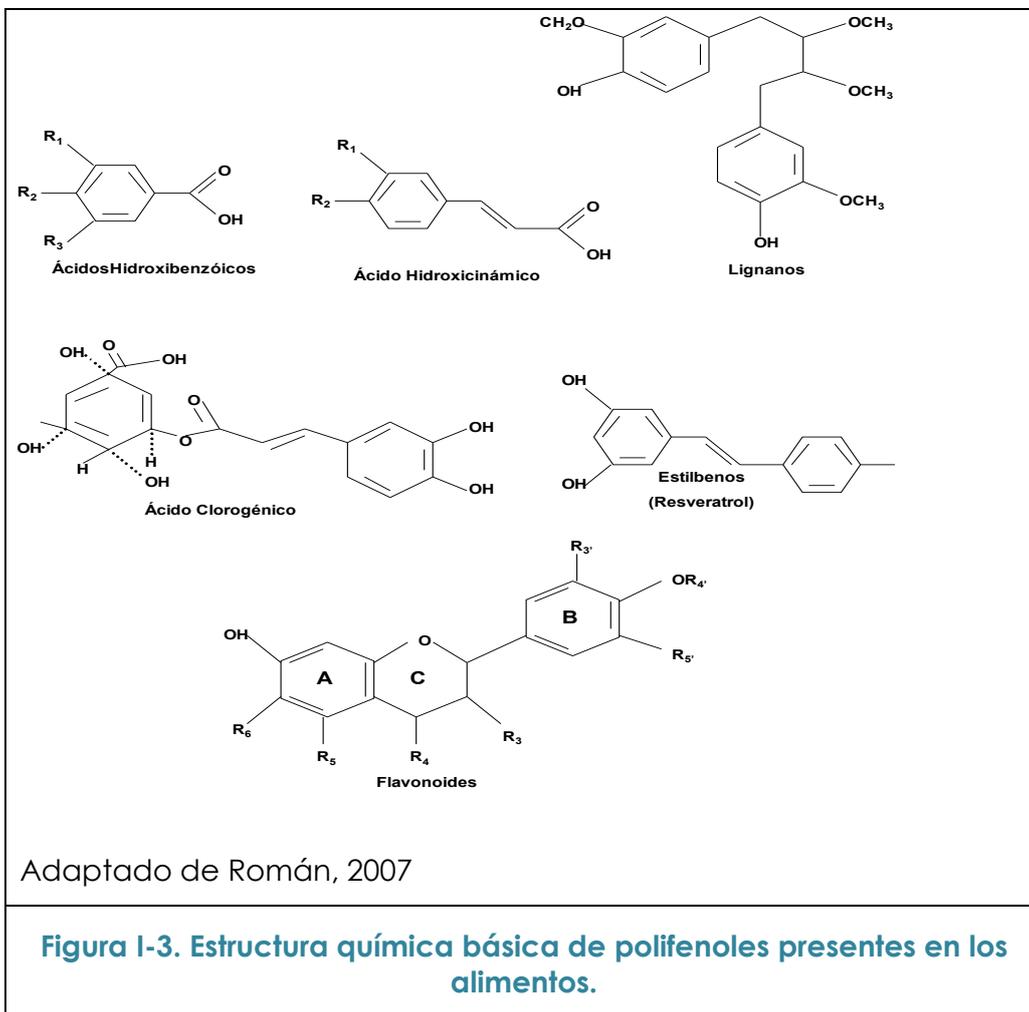
Su estructura química, con varios anillos unidos por dobles enlaces les permite con facilidad captar RL (Heim, 2002), desactivarlos o impedir su formación de modo directo o indirecto. Son capaces de quelar el hierro y el cobre, favorecer la acción de enzimas antioxidantes (como la catalasa o la SOD) e inhibir enzimas pro oxidantes (como la ciclooxigenasa, mieloperoxidasa, NADPH oxidasa, la xantina-oxidasa o la fosfolipasa A2) (Mira, 2002; Ozona, 2003; Horón, 2002; Varga, 2004).

La acción combinada de los polifenoles potencia la capacidad antioxidante mediante la acción combinada de varios de ellos (Valls, 2004; González, 2001) (Figura I-3). El aumento de la capacidad antioxidante total del plasma tras la ingesta de 500 mg de polifenoles fue similar a la observada tras la ingesta de 1 g de vitamina C (Whitehead, 1995). Los flavonoides pueden proteger frente a los daños inducidos en hepatocitos por la Adriamicina y proteger al ADN del daño oxidativo (González, 2001; Valls Bellés, 2005).

La ingesta de té, chocolate y otros alimentos ricos en polifenoles se ha relacionado con una disminución del de enfermedades cardiovasculares (Vita, 2005; Hubbard, 2003; Middleton, 2000) y cáncer de colon (Martínez-Flores 2002). En el colon podrían actuar como secuestradores de diversos RLs (Halliwell, 2007) (Figura I-6).

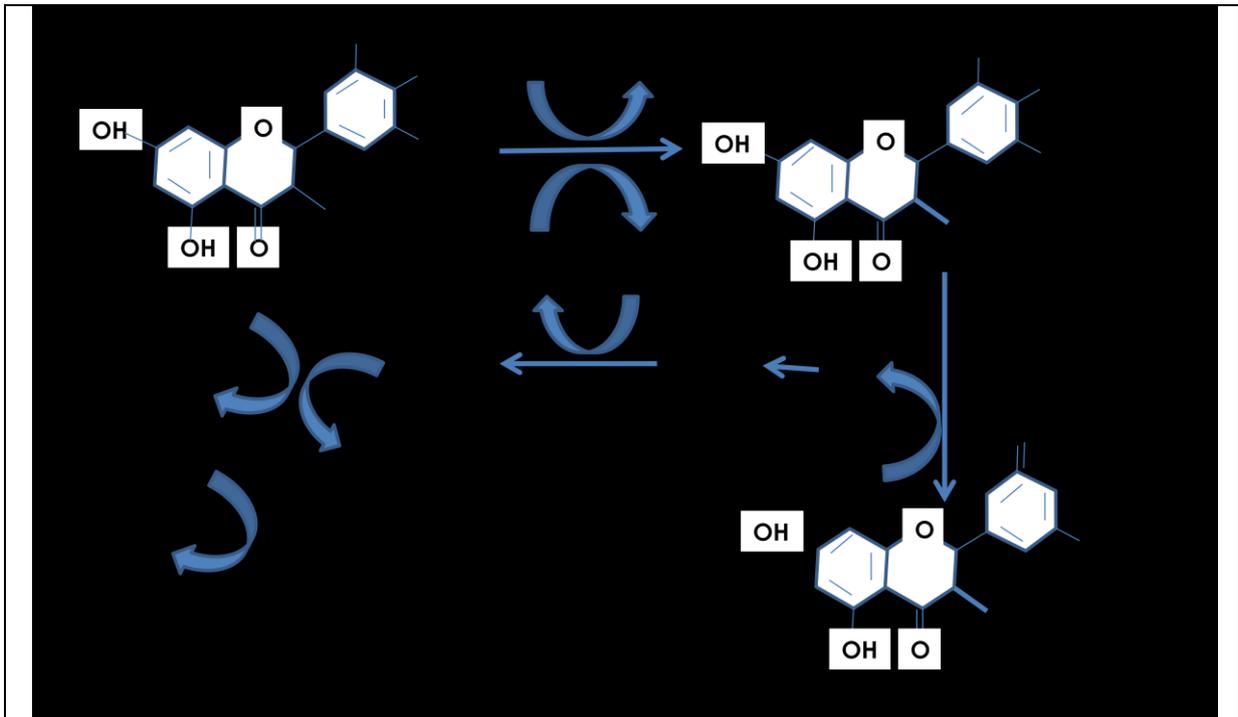
Las **Poliaminas** protegen del daño oxidativo a lípidos y proteínas, estabilizan las cargas negativas del ADN y del ARN durante los procesos de transcripción y protegen al ADN del daño oxidativo de los rayos  $\gamma$ , X o UV (Correa, 2009). La espermina y la espermidina tienen una actividad antiglicación significativa en concentraciones fisiológicas, y protegen frente a diversas enfermedades crónicas como la obesidad o las enfermedades cardiovasculares (Gugliucci, 2003; Codoñer-Franch, 2011; Soda, 2012).

## I. INTRODUCCION



Las **Melanoidinas** son polímeros formados al reaccionar carbohidratos y moléculas que contienen un grupo amino libre (aminoácidos, péptidos y proteínas) por la denominada reacción de Maillard. Este grupo de sustancias, de color marrón y elevada capacidad antioxidante es capaz de inhibir la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (Valls, 2001; Dittrich 2003; Rivero, 2005).

## I. INTRODUCCION



Adaptado de Valls, 2004.

**Figura I-4 Estructura química de los polifenoles y acciones antioxidantes**

Aunque **minerales como el zinc, el selenio o el manganeso** no pueden ser considerados antioxidantes, su presencia es indispensable para el correcto funcionamiento del sistema antioxidante y deben ser aportados por la alimentación. El Zinc por ejemplo 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 glutatión peroxidasa donde deriva la importancia de su función como antioxidante. El **manganeso** es un componente necesario para algunas enzimas como la superóxido dismutasa,

Para algunos autores, el aporte exógeno de antioxidantes puede en parte, determinar el ritmo del metabolismo celular que se adapta para no exceder la disponibilidad de antioxidantes provisto desde el tracto gastrointestinal (Wally 2012).

## I. INTRODUCCION

### 2. ALIMENTACION, APORTE ANTIOXIDANTE Y SALUD.

#### A. LOS ALIMENTOS: FUENTE DE ANTIOXIDANTES.

El ser humano obtiene, por medio de los alimentos de la dieta, los nutrientes necesarios para cubrir las necesidades de reposición, función o energía (y crecimiento durante la etapa infantil). Pero además obtiene sustancias cuyas propiedades funcionales pueden influir en la salud de los individuos de forma favorable o desfavorable. Uno de estos aspectos funcionales consiste en el mantenimiento del equilibrio entre compuestos oxidantes y reductores: el equilibrio REDOX.

De los alimentos se obtienen moléculas antioxidantes (como vitaminas, polifenoles, y flavonoides) y elementos cuya reposición precisa el organismo (Fe, Cu, Zn, Mg, Mn, Se, etc.) para el funcionamiento correcto de los sistemas antioxidantes o para la reparación del daño causado por la oxidación (Li, 2009). Sin embargo, la dieta también puede causar agresiones oxidativas como las derivadas de un exceso de nitrosaminas o de calorías que pueden originar desequilibrios oxidativos que aumentan las necesidades de antioxidantes.

Los alimentos de origen vegetal como verduras, cereales, frutas y algunos de sus derivados: zumos, vino y cerveza son especialmente ricos en antioxidantes como la vitamina C, la vitamina E o los carotenoides, la Coenzima Q10 o los polifenoles (Martínez, 2009).

La **vitamina E** se encuentra presente en diversos aceites como el de girasol, maíz, soja y colza y en frutos secos como nueces y avellanas principalmente. También son ricos en vitamina E las legumbres, la leche y algunos cereales (en alimentos no refinados: integrales).

La **vitamina C** 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, las crucíferas (coles, repollo, brécol). De los productos de origen animal, el hígado la contiene en pequeñas

## I. INTRODUCCION

cantidades (Mataix, 2002). Los depósitos corporales son escasos y no duran mucho tiempo; se elimina por la orina en pequeñas cantidades y es preciso 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. Una vez ingerida se absorbe en duodeno y yeyuno por transporte activo mediado por  $\text{Na}^+$ . Los fitatos y la fibra de los alimentos interfieren con su absorción (Mataix, 2002).

La **vitamina A** la obtenemos a través de la dieta en forma lipófila (retinol) e hidrófila (carotenoides). Estos últimos son los pigmentos responsables del color amarillo, naranja o rojo de frutas y verduras y se encuentran en los vegetales de estos colores: tomate, calabaza, mango, zanahoria o espinacas que son ricos especialmente en  $\beta$ - y  $\alpha$ -carotenos, en licopenos y en luteína. El derivado lipofílico (retinol) 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 la biodisponibilidad de los diferentes carotenoides viene condicionada también por el procesado, el alimento que lo contiene y las estructuras terciaria y cuaternaria de la molécula del carotenoide (forma física)(de Pee, 1996; Stahl 2002). Los carotenoides son absorbidos, mayoritariamente en el intestino delgado por difusión pasiva (Erdman, 1993; Parker, 1996), incorporados a los quilomicrones y transportados por la linfa hasta el hígado. Allí son almacenados y posteriormente distribuidos cuando son requeridos. Estos precursores de vitamina A son mayoritariamente transformados en retinol en el enterocito aunque también, en parte en el hígado y en otros tejidos. La absorción de los carotenos procedentes de la dieta, puede verse afectado por la presencia de grasa en la dieta, por otros componentes que inhiben su absorción, y por prácticas de cocinado que aumentan las pérdidas. Las infecciones parasitarias inhiben su absorción. Ante un exceso de carotenoides en la dieta, se saturan los puntos de difusión hacia el interior de los enterocitos y los enterocitos cargados de carotenos, son eliminados a la luz intestinal. La eliminación de carotenos parece

## I. INTRODUCCION

hacerse fundamentalmente a través de la bilis pero no por orina (Bowen, 1993; Leo, 1995). En la bilis se excreta un 1% de la fracción plasmática diaria y esta posiblemente es reabsorbida posteriormente (Stahl, 2002).

Los **polifenoles** se encuentran principalmente en frutas y verduras y en bebidas de origen vegetal, como el té, el café, el vino o la cerveza. Su contenido varía en los distintos alimentos y depende también de su estado de madurez, el momento de la cosecha, el tipo de cultivo, la exposición solar, el procesado y el almacenaje al que haya sido sometido (Aherne, 2002; Cheynier, 2005). Por ejemplo el pelado de vegetales y frutas, disminuye el contenido en polifenoles; la ebullición durante 15 minutos provoca la disminución de un 15% de su contenido en cebollas y tomates y el 50% del contenido en quercetina desaparece al freír el tomate (Manach, 2004). Su absorción se realiza a nivel intestinal de los polifenoles, pero no es uniforme ni todavía bien conocida. Son resistentes a la acción ácida del estómago y en intestino delgado se absorben algunos de ellos (agliconas y determinados glicósidos) pero muchos son hidrolizados por la flora colónica (Scalbert, 2000; Pietta, 1998). Tras su absorción son conjugados en el hígado y participan en la circulación enterohepática lo que puede aumentar su tiempo disponible en plasma (Manach 2004). Los que mejor absorbe el intestino humano son las isoflavonas y el ácido gálico, seguido por catequinas, flavononas y quercetinas (Manach 2005). Los polifenoles parecen ser más eficaces para inhibir la oxidación del colesterol LDL y las lipoproteínas transportadoras del colesterol LDL que el ácido ascórbico, el alfa tocoferol o el betacaroteno, según los estudios de Vinson (Vinson, 1995). Se ha descrito para los polifenoles presentes en la dieta acciones tan importantes como la prevención de la rotura de la doble hélice del ADN o de la toxicidad por la quelación de metales (García-Alonso 2007), el secuestro de radicales libres por inhibir la acción de los ROS (Aboul-Enein 2007), la reducción de la acción del radical tocoferoxilo (Pazos, 2007) y la modulación de actividades de otros compuestos vocativos (Karamenderes, 2007). Además se han descrito acciones antitumorales, antiinflamatorias y preventivas de tumores (Shoeb, 2007)

## I. INTRODUCCION

Los flavonoles, como la quercetina o el kaempferol son compuestos comunes en frutas y verduras en las que se encuentran en forma glicosilada. Son muy abundantes en las cebollas (1200 mg/Kg) y están presentes en el vino tinto y el té (45 mg/L) (Macheix, 1990). Las flavonas glicosiladas como la lutelina y la epigenina están presentes en el perejil y en forma polimetoxilada (como la tangeritina, nobiletina o sinensetina) son muy abundantes en los cítricos (la mandarina puede contener hasta 6500 mg/L) (Manach, 2004). Las flavanonas son abundantes en el tomate, los cítricos o la menta. En naranjas y mandarinas se encuentra en la parte de las membranas internas de la fruta, por lo que su contenido se pierde en parte en el zumo (Tomas-Barberan, 2000). Los flavanoles como las catequinas, están especialmente presentes en el vino tinto (hasta 300 mg7/L), en el té verde (Lakenbrink, 2000) y en la cerveza con alcohol (410 mg/L) y sin alcohol (343 mg/L) (Valls-Bellés, 2005). Las isoflavonas como la genisteína, didzeína y gliciteína se encuentran fundamentalmente en las leguminosas y la soja. Durante el procesado con calor, como en la leche de soja, son hidrolizadas a glicósidos (Cassidy, 2000). Las proantocianidinas, procianidinas o antocianidinas son las responsables del carácter astringente de frutas y bebidas y su contenido varía con el estadio madurativo de la fruta. Están presentes en el vino tinto, en algunos cereales y en la piel de muchas frutas. El contenido está en función de la intensidad del color llegando hasta 4.000 mg/kg en grosellas y fresas y 350 mg/L en el vino tinto(Clifford, 2000).

Las **melanoidinas** son las sustancias que dan color marrón a alimentos como el café, la malta, la bollería, o la cerveza.

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 (principalmente las enzimas).

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 (McCall, 1999; Williamson, 1999; Gardner, 2000; Van Duyn,

## I. INTRODUCCION

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

## B. NUTRICIÓN PERINATAL Y SALUD.

Embarazo, parto y nacimiento presentan retos oxidativos muy importantes para los organismos materno y neonatal. Durante la gestación el mantenimiento del equilibrio oxidativo de madre e hijo, dependen del estado oxidativo materno y para responder a las exigencias de cada situación la mujer precisará contar con unas reservas y un sistema de reposición adecuados y por ello la importancia de una dieta adecuada y equilibrada. El embarazo, incluso transcurriendo normalmente, supone una importante sobrecarga energética y de nutrientes que resultan de la necesidad de hacer frente a las exigencias que imponen el crecimiento fetal, el de la placenta y el de determinados órganos maternos (útero y mamas fundamentalmente). Se ha calculado que una gestación tiene un coste energético adicional medio de 80.000 Kcal para un período de 9 meses. Además el metabolismo basal aumenta al menos, un 15 % durante la segunda mitad del embarazo en parte debido al importante incremento en los niveles de determinadas hormonas (la tiroxina, las hormonas cortico-suprarrenales y las hormonas sexuales). Este incremento metabólico junto a la génesis y desarrollo del organismo fetal llevan aparejados un incremento del consumo de oxígeno y por tanto suponen una importante sobrecarga oxidativa. Se ha calculado que al final del embarazo el consumo de O<sub>2</sub> de la mujer embarazada es un 20% superior a su gasto en época no gestante. Si el embarazo cursa con algún tipo de problema

## I. INTRODUCCION

sobreañadido: si la madre es muy obesa, si hay una diabetes gestacional o una preeclampsia, si la madre tiene una enfermedad previa o si el parto es prematuro (Lee, 2011), o distócico o acaba en cesárea (Georgeson, 2002), la sobrecarga aumenta. Otros factores como la exposición a xenobióticos como el tabaco, alcohol, drogas o radiaciones, una dieta inadecuada con un excesivo consumo de grasas) que pueden agravar esta situación de sobrecarga oxidativa (Butte, 2004; Forsum, 2007; Agarwal, 2012).

El nacimiento y la adaptación perinatal, son en sí mismos procesos de sobrecarga oxidativa para el recién nacido que además sufre un gran incremento de exposición a O<sub>2</sub> ambiental (respecto a los niveles intraútero) al nacer. Por todo ello, la época perinatal probablemente supone una de las épocas de mayor demanda de defensa antioxidante para el ser humano en un momento en el que cuenta con un sistema antioxidante propio limitado.

La infancia se ha definido como un periodo de alto riesgo nutricional (Ballabriga 1990, Negrato, 2013) y un daño oxidativo no resuelto adecuadamente puede tener consecuencias a largo plazo: arterioesclerosis (Codoñer, 2008), cáncer y enfermedades autoinmunes (Vickers, 2011), entre otras.

Hoy sabemos que la dieta y el aporte de antioxidantes de la misma influyen sobre la salud ya desde el periodo intrauterino y la infancia más temprana. Los estudios epidemiológicos realizados en los últimos 20 años han demostrado cómo los cambios en la alimentación de la madre durante el crecimiento fetal y durante el desarrollo postnatal temprano influyen de manera notable sobre la aparición ulterior de problemas cardiovasculares, obesidad, diabetes tipo II, osteoporosis y otras enfermedades de la vida adulta (Valls, 2007; Novak, 2006). Y, problemas como la obesidad, de prevalencia creciente en nuestra población infantil (Lasarte, 2014), suponen importantes amenazas oxidativas sobreañadidas (Codoñer-Franch, 2010; Codoñer-Franch, 2011; Codoñer-Franch, 2012).

La composición de la dieta materna es pues determinante no sólo para un desarrollo y crecimiento adecuados del feto durante el embarazo (Moore, 2004; MacLaughlin, 2005; Borowczyk, 2006) sino también para asegurar un aporte

## I. INTRODUCCION

adecuado de antioxidantes que evite el estrés oxidativo a ambos. Una dieta adecuada pre-gestación, durante el embarazo y durante el periodo puerperal y la lactancia permiten a la mujer hacer frente adecuadamente a las necesidades antioxidantes y asegurar un buen estado oxidativo propio y de su progeñie. Sabiendo que cuando se produce un desequilibrio REDOX el estrés oxidativo resultante es capaz de dañar tanto a la madre como al recién nacido (Al-Gubory, 2010), se ha recomendado incluir en la dieta de la mujer embarazada y lactante alimentos ricos en antioxidantes como la vitamina E (presente en huevo y mantequilla, aceites vegetales y legumbres), la vitamina C (abundante cítricos, piña y determinados vegetales como el pimiento ó el tomate), los carotenoides (abundantes en zanahoria, calabaza y frutas de color anaranjado ó amarillento, como el mango o el kiwi amarillo) y los polifenoles (presentes en vegetales como la uva) (Zeisel, 2009).

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

## C. ESTRÉS OXIDATIVO NEONATAL

El incremento brusco de los niveles de  $O_2$  en el organismo neonatal, originado con los primeros movimientos respiratorios pulmonares tras el nacimiento junto al estrés del parto, someten al recién nacido humano a elevadas dosis de oxidación y a la subsiguiente formación de especies reactivas de oxígeno lo que en conjunto supone una situación de estrés oxidativo no despreciable (Friel, 2004). Por otra parte, el crecimiento y la maduración de órganos y sistemas que caracterizan a la etapa neonatal y de primera infancia suponen demandas oxidativas que no ocurren en otras épocas de la vida. Sin embargo, en estas etapas y especialmente en el momento del nacimiento, el neonato adolece de un sistema antioxidante

## I. INTRODUCCION

propio poco desarrollado de inmadurez proporcionalmente inversa a la edad gestacional al nacimiento (Shekeeb, 2008). Durante la gestación tiene lugar un trasvase trasplacentaria de sustancias antioxidantes de madre a hijo, destinado a ayudar al recién nacido sano a afrontar el estrés oxidativo tras el nacimiento. Este trasvase se produce principalmente en el tercer trimestre (Robles, 2001). Los recién nacidos tienen, en comparación con el adulto, menores niveles plasmáticos de antioxidantes como la vitamina E, beta carotenos o grupos sulfidrilo, menores niveles de proteínas quelantes de metales como la ceruloplasmina o la transferrina (Gitto, 2003) y menor expresión de actividad enzimática con niveles inferiores de CU/Zn superoxido dismutasa eritrocitaria (Saugstadt 1996), de SOD citosólica, de GPx y de  $\alpha$ -proteinasa (Buonocuore, 2002; Ochoa 2003; Davis, 2010).

Aunque no bien entendidos todavía los mecanismos con que el neonato hace frente a este estrés oxidativo postnatal, se ha constatado que el desequilibrio comienza a recuperarse a partir de las 72 horas tras el nacimiento aunque probablemente se mantiene hasta más allá del 6º mes (Ochoa, 2003; Friel, 2004). Se ha observado que, la posibilidad de incrementar la síntesis de antioxidantes en respuesta a la hiperoxia u otros estímulos oxidativos es deficiente en el recién nacido, si se compara con el individuo adulto (Davis, 2010). El aporte de antioxidantes a través de la leche materna al incluir enzimas antioxidantes, palia esta situación. Se ha observado una peor situación REDOX en los neonatos alimentados con fórmulas artificiales cuya CAT total es muy inferior (Friel, 2011).

La mayoría de las enfermedades neonatales cursan con aumento de RL (Buonocuore, 2002). La hipoxia por ejemplo es uno de los principales factores que inducen la producción de FR en el periodo perinatal. La carencia de oxígeno induce un parón en la fosforilación oxidativa, y el subsiguiente aumento de subproductos de la degradación del ATP que rápidamente constituyen el substrato idóneo para la activación de la hipoxantina oxidasa y la consiguiente producción de RL en la fase de reperusión. Además de los RL que se producen por la autooxidación de los elementos reducidos por la hipoxia de la cadena respiratoria o de la liberación de hierro libre desde la ferritina o por acúmulo excesivo de  $\text{Ca}^{2+}$ . Y si

## I. INTRODUCCION

la hipoxia es fuente de estrés oxidativo, también lo es la exposición a niveles elevados de oxígeno por necesidades terapéuticas o a elevadas concentraciones de hierro no unido a proteínas (Buonocuore, 2002; Saugstad, 2006; Saugstad, 2014).

El estrés oxidativo es mayor en el recién nacido prematuro ya que la maduración del sistema antioxidante y el trasvase de antioxidantes se produce especialmente en la última parte de la gestación (Buonocuore, 2002; Ledo, 2009; Lee, 2011). Con menores reservas de antioxidantes y menor capacidad de expresión enzimática los prematuros presentan niveles persistentemente más elevados de subproductos de daño oxidativo como hidroperóxidos y una recuperación del estrés oxidativo detectable al nacimiento más lenta y, además, muchos de ellos suman necesidades extras de O<sub>2</sub> tras el nacimiento por problemas derivados de su inmadurez (Vento, 2001; Buonocuore 2002; Ochoa 2003; Yeung, 2006; Shan 2009). Algunos autores han acuñado el término "enfermedades neonatales por radicales oxigénicos" para algunas enfermedades más prevalentes entre los prematuros (Palomino, 1998; Lee, 2011) como la enterocolitis necrosante (Lee, 2011; Aydemir, 2011) la retinodisplasia del prematuro (Tin, 2007), o la leucomalacia periventricular, estrechamente relacionadas con el exceso de oxidación y la incapacidad neonatal para neutralizarlo (Lee, 2011; Ezaki, 2008). El aumento de prevalencia de enfermedades degenerativas en la edad adulta que se ha observado en recién nacidos de bajo peso para la edad gestacional (diabetes tipo II, asma, hipertensión o enfermedad coronaria) también se ha asociado a un deficitario sistema de reparación antioxidante tras el parto (Franco, 2007).

El tipo de parto también influye en el grado de estrés oxidativo al que el neonato se ve sometido (Burton, 2011, Georgeson, 2002). Se ha descrito que los recién nacidos que nacen mediante cesárea pueden presentar un mayor nivel de hidroperóxidos lipídicos que los niños que nacen por parto vaginal en los que se detectó una mayor capacidad antioxidante total en suero (Mutlu, 2011).

Un buen estado oxidativo en esta primera época de la vida, puede determinar el estado de salud futuro, especialmente en lo concerniente a determinadas enfermedades que han sido relacionadas con desequilibrios

## I. INTRODUCCION

oxidativos (obesidad, diabetes, cáncer, enfermedades autoinmunes y otras). Y parece evidente que el recién nacido, nace precisando aportes que complementen un sistema inmaduro y unos depósitos escasos, necesidades que serán más acusadas en los recién nacidos pretérmino o enfermos (Yuan-Shun, 2005; L'Abbe, 2000; Friel 2004; Friel, 2011).

## D. ALIMENTACIÓN Y EPIGENÉTICA.

En los últimos años, la investigación sobre las influencias epigenéticas de la alimentación en la época de la gestación y en la primera infancia, han permitido avanzar en el conocimiento de cómo la nutrición de la madre durante la gestación puede a través de cambios epigenéticos marcar el desarrollo del nuevo ser, e influir "a futuro" en su salud y en la de siguientes generaciones (Verducci, 2012).

Literalmente, epigenética significa "sobre la genética" y en este término se engloban aquellos procesos capaces de inducir cambios en la expresión genética que se heredan sin alterar la cadena del ADN (Verducci, 2012). Los procesos epigenéticos más importantes son: la metilación de la citosina (que modifica el plegamiento o desplegamiento de la cadena en determinados puntos), la acetilación de las histonas, la remodelación de la cromatina y la acción del micro ARN no codificador. Todos estos procesos inducen modificaciones de consecuencias sobre las bases neurobiológicas de la memoria, el aprendizaje y la respuesta al estrés y en la expresión de enfermedades como el cáncer o la diabetes mellitus y el autismo (Wally, 2012). Entre otros factores, la expresión de los genes puede ser alterada epigenéticamente por la alimentación.

Nutrientes como el ácido fólico, la vitamina B12, la vitamina B6, la riboflavina, la metionina, la colina o la betaína, el ácido retinoico, la curcumina, el resveratrol o los polifenoles pueden influir sobre la metilación del ADN al regular los niveles del dador universal de moléculas -CH<sub>3</sub> (la S-adenosil-metionina (SAM)) y el inhibidor de la metiltransferasa (la s-adenosil-homocisteína (SAHM)) o incluso inducir la metilación del ADN o de sus histonas (Malireddy, 2012). La relación entre la concentración de SAM/SAHM depende de la disponibilidad de cisteína y de la

## I. INTRODUCCION

actividad de la enzima metionin-sintetasa (que depende para su función de niveles adecuados de vitamina B12 y ácido fólico). La actividad de esta enzima es muy sensible al estrés oxidativo, pudiendo de esta manera dicho estrés inducir cambios epigenéticos (Holliday, 2002; Saetrom, 2002). De ahí la importancia también en este aspecto de un aporte equilibrado y adecuado de antioxidantes que permita mantener un estado oxidativo apropiado a las necesidades de nuestro organismo.

Cada vez hay más evidencia de que algunas de estas enfermedades como la diabetes tipo II, la hipertensión y la obesidad entre otras pudieran tener su origen en el periodo neonatal al alterar la expresión genética por mecanismos epigenéticos inducidos por ROS (Gluckman, 2008; Ledo, 2009)

### 3. LECHE HUMANA, COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES ANTIOXIDANTES.

Cada vez hay mayor evidencia de que la alimentación en la infancia influye sobre diferentes procesos fisiológicos y metabólicos a corto, medio y largo plazo e influye a futuro sobre la aparición de algunas enfermedades por ejemplo a través del estado oxidativo durante el desarrollo. Durante la etapa más determinante de este desarrollo, la infancia, la leche materna es el alimento de especie diseñado para cubrir las necesidades específicas del recién nacido y lactante humano. Y, esta etapa es la única en la que el ser humano dispone de nutrientes específicos (de especie) y por tanto idóneos para el organismo inmaduro y en pleno proceso de formación de órganos y tejidos.

Además de estos nutrientes, la leche materna es rica en componentes bioactivos de importancia clave en la modulación de rutas metabólicas y en la respuesta inflamatoria, antioxidante e inmunitaria (Al-Gubory, 2010). La actividad más relevante de muchos de estos compuestos bioactivos es fundamentalmente extranutricional y, aunque están presentes en la leche en pequeñas cantidades, su importancia es cada vez más reconocida (Aycicek, 2006; Lawrence, 2011). El aporte

## I. INTRODUCCION

antioxidante de la leche suple los déficits de antioxidantes del recién nacido y le ayuda a combatir el estrés oxidativo propio de esta época (Li, 2009) y a reparar los daños producidos (Friel, 2011). La capacidad antioxidante de la leche humana se ha relacionado con efectos tan importantes como la protección del desarrollo de la función cognitiva y el desarrollo psicomotor de los lactantes (Griffiths, 2002). Se ha demostrado que la capacidad antioxidante total (CAT) medida en el plasma de los lactantes amamantados es más elevada que la CAT de los recién nacidos no amamantados (Aycicek, 2006).

### A. VARIACIONES EN LA COMPOSICIÓN DE LA LECHE MATERNA.

La leche humana es un producto vivo y complejo con componentes que provienen de la filtración desde el plasma materno o que son sintetizadas "de novo" en la propia glándula. La concentración y presencia de los distintos componentes en relación con diversos factores: varía a lo largo del día, a lo largo de la lactancia, de una madre a otra: con las características genéticas de la madre, la duración de la gestación, el tiempo de lactancia, el momento del día o a lo largo de la toma o el estado nutricional (Borowczyk, 2006; Brand-Burton, 2011; Bachour, 2012; Ballard, 2013) y las influencias son también distintas dependiendo del nutriente estudiado.

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

**El Calostro** que la mama produce durante los primeros días después del parto, es un fluido espeso y de color amarillento debido a la alta concentración de beta carotenos. Su volumen puede variar entre 2-20 mL por toma en los 3 primeros días, lo que es suficiente para cubrir las necesidades nutricionales del recién nacido. Su valor calórico medio es de 67 Kcal/100 mL y contiene mayor cantidad de proteínas (inmunoglobulinas) (Ballard 2013), vitaminas A, E, K, ácido siálico, colesterol y algunos minerales (sodio, hierro, zinc, azufre, potasio, manganeso, selenio) que la leche madura (Lawrence, 2005). Es fundamental para el recién nacido por su composición nutricional y por su elevado contenido en factores defensivos: antiinfecciosos y antioxidantes como los betacarotenos, inmunoglobulinas A,

## I. INTRODUCCION

lactoferrina, linfocitos y macrófagos. Contiene gran cantidad de flora bifidógena para colonizar el intestino neonatal y prebióticos que la favorecen y que junto a los factores de defensa son capaces de evitar la adherencia de microorganismo patógenos en el tubo digestivo neonatal. Así aporta enzimas que ayudan al funcionamiento y maduración del sistema digestivo del lactante, facilitan la evacuación del meconio y disminuyen el riesgo de hiperbilirrubinemia en el recién nacido (Lawrence, 2007). Y es la aporta gran cantidad de células madre pluripotenciales (Hassiotou, 2014).

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

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

## B. COMPONENTES DE LA LECHE HUMANA.

Los principales componentes de la leche madura son: agua, lactosa, galactosacáridos, proteínas y compuestos nitrogenados, grasa, minerales y vitaminas. También contiene elementos traza, enzimas, aminoácidos, hormonas, células vivas, mRNA y flora bacteriana. Con un pH=7, su aporte energético oscila entre 70 y 76 Kcal/100mL. Contiene un 88 % de agua, lo que asegura un aporte suficiente al lactante durante los primeros 6 meses de vida (Wojcik, 2012; Lawrence, 2005). Para el propósito de esta tesis abordaremos la composición de la leche humana, principalmente desde el punto de vista de su contenido y funciones antioxidantes, campo este en el que aún queda mucho por investigar hasta

## I. INTRODUCCION

caracterizar completamente todas las sustancias antioxidantes presentes en la leche humana y sus funciones.

### i. Hidratos de carbono (HC).

El principal HC de la leche humana es la lactosa (6-7 g/100 mL). Es sintetizada en la glándula mamaria a partir de glucosa y galactosa y contribuye al 40% de las calorías de la leche materna. Es necesaria para la absorción del calcio, hierro, magnesio y otros elementos y como aporte energético. La galactosa obtenida del desdoblamiento a nivel intestinal de la lactosa y otros azúcares como glicoesfingolípidos son imprescindibles para la formación entre otros de los galactolípidos, indispensables para el desarrollo del sistema nervioso central del recién nacido. La leche humana contiene glucosa, galactosa, L-fucosa y ácido siálico en concentraciones de 1-40 mg/l. El contenido total en oligosacáridos oscila entre 600-900 mg/dL. Además de la importancia de los oligosacáridos como parte de glucolípidos (esfingolípidos y gangliósidos) y glicoproteínas, para la formación de tejido nervioso y en la defensa antiinfecciosa, cada vez cobra mayor interés la capacidad antiinflamatoria que aportan al recién nacido que puede contribuir a la baja incidencia de enfermedades inflamatorias en el neonato amamantado (Newburg, 2013). A ello probablemente contribuye el aporte de otros oligosacáridos y amino azúcares que promueven la colonización intestinal por flora bacteriana bifidógena (*Lactobacillus Bifidus*), inhiben el crecimiento de bacterias patógenas, hongos y parásitos (Lawrence, 2011; Newburg, 2013).

### ii. Fracción nitrogenada

La leche madura contiene compuestos nitrogenados (la llamada fracción nitrogenada) en una concentración de 0,9 gr/100 mL. La fracción protéica (principalmente caseína, seroproteínas y mucinas) procede tanto de secreción glandular como de ultrafiltración del suero materno. La proporción lactosuero/caseína es de 80/20 en calostro, pero esta proporción va cambiando

## I. INTRODUCCION

para ser de 60/40 a las pocas semanas y finalmente se mantiene en 50/50 la mayor parte de la lactancia (Lonnerdal 2003). La alfa-lacto albúmina constituye el 10 a 12% del total de las proteínas, interviene en la síntesis de lactosa y es específica de la leche materna, Otras proteínas representativas del lactosuero son la seroalbúmina, la lactoferrina y las inmunoglobulinas A, G y M (Lonnerdal, 2010).

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

La **caseína** constituye el 30-40% de las proteínas de la leche humana, y está presente en una concentración media de  $3,4 \pm 0,97$  g/L que no varía a lo largo de la toma (entre leche de inicio y del final) aunque sí es variable entre madres. Su función principal es el aporte de aminoácidos, fósforo y calcio. La fracción beta-caseína es la más abundante y es bien digerida por el intestino neonatal al formar coágulos más pequeños que los de la caseína de la leche de otras especies animales, como la vaca. Prácticamente ausente de la leche humana en los primeros días, empieza a sintetizarse a partir del 3-4 día y las concentraciones aumentan progresivamente a medida que la leche madura. La leche de mujer contiene sólo 2 fracciones de caseína: la beta y la kappa caseína (no contiene ni alfa ni gamma caseína) (Cervato, 1999). La beta caseína es la más abundante, de elevada fosforilación, forma complejos fosfopeptídicos más solubles, con el  $Ca^{2+}$  que contribuyen a la elevada biodisponibilidad del calcio en la leche humana (Lonnerdal, 2006). La K-caseína, es una glicoproteína que contiene residuos de ácido siálico cargados negativamente, está presente en menor cantidad que la beta caseína y su principal función es estabilizar la micela de caseína, asegurando en su interior al fosfato cálcico. Inhibe la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal neonatal al actuar como un receptor análogo, por ejemplo del H Pylori (Lonnerdal 2010). La importancia antioxidante de las caseínas radica en su

## I. INTRODUCCION

capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, posiblemente a través de un aumento de la auto-oxidación del hierro. Además los péptidos resultantes de la digestión de la caseína tienen una elevada capacidad para secuestrar el anión superóxido. (Lonnerdal, 2003; Li, 2009).

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

La **lisozima** constituye una importante fracción de las proteínas del lactosuero de la leche humana y su concentración es mayor en el calostro. El

## I. INTRODUCCION

contenido de lisozima en la leche humana es más estable y 3000 veces más elevada que en la leche de vaca. Tras los primeros días, los niveles bajan de 85 a 90 mg/mL en calostro, a 25 mg/mL entre las semanas 2ª y 4ª, con una elevación progresiva posterior durante los primeros 6 meses hasta alcanzar un nivel meseta de 250 mg/mL que se mantiene durante los primeros 24 meses de vida. No se ha demostrado que las madres malnutridas tengan menores niveles de lisozima en su leche (Lawrence, 2010). La lisozima ofrece protección contra la oxidación aguda y crónica por mecanismos que abarcan desde la supresión de ROS hasta la modificación de respuesta genética. Esta molécula es capaz de elevar los niveles normales de reservas antioxidantes y confiere resistencia frente a los RL y ROS al disminuir la expresión de los genes p66 y cJun que determinan la respuesta al estrés (Liu, 2006). Además participa en la detoxificación de los productos de glicación avanzados (AGEs); secuestra, recicla y disminuye sus actividades proinflamatorias, y mejora la defensa antioxidante.

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

Se han detectado niveles significativos de **enzimas antioxidantes** en leche humana hasta los 12 meses al menos (Lindmark-Masson, 2000; Friel, 2004), aunque los estudios son escasos y no se sabe bien cómo influyen otros factores (como la dieta, el tabaquismo o el uso de suplementos) en su contenido. La **catalasa** presente en la leche humana puede modular la respuesta oxidativa, reduciendo el citocromo C y consumiendo agua oxigenada (Grazioso, 1996). La **superóxido dismutasa** cataliza la desactivación del radical superóxido y su actividad está positivamente correlacionada con la ingesta de cobre en los prematuros. Su concentración en leche materna es mayor en la leche de madres de RN a término y aumenta en los

## I. INTRODUCCION

primeros 3 meses de lactancia tanto en madres de RN a término como en las madres de prematuros. Se han observado niveles en leche que multiplican de 10 a 25 veces los niveles plasmáticos (L'Abbe, 2000), El contenido en leche materna de **glutathion oxidasa** (GPx) puede llegar a quintuplicar los niveles séricos maternos. Su contenido continua aumentando desde los primeros días y al menos durante las primeras 12 semanas postparto y es mayor en la leche de madres de lactantes a término en comparación con madres de prematuros (L'Abbe, 2000). Se ha observado una relación positiva entre los niveles de esta enzima y los de ácidos grasos poliinsaturados en la leche humana, habiéndose especulado sobre el papel protector de la misma frente a la oxidación de estas moléculas (Ezaki, 2007).

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

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

## I. INTRODUCCION

Las **poliaminas** participan en el crecimiento y maduración del sistema digestivo y son sintetizadas activamente por la glándula mamaria durante la lactancia. En la leche humana se ha aislado espermidina, espermina y putrescina. Los niveles en la leche aumentan bruscamente (de 8 a 12 veces) en los primeros días de lactancia y luego se estabilizan a niveles más bajos, a lo largo de todo el periodo de amamantamiento. Aunque se han observado variaciones inter madres, se desconocen los factores que influyen sobre las mismas (Larque, 2007). Espermina y espermidina tienen acciones antiglicación significativas y es muy probable que contribuyan al bajo nivel de compuestos glicosados presentes en el plasma de los lactantes amamantados (Dittrich, 2006). Una concentración de espermina en leche por debajo de 2 nmol/mL se ha relacionado con un aumento de riesgo del 80% para el desarrollo posterior de alergia, mientras que el riesgo disminuyó a 0% con concentraciones superiores a 13 nmol/mL (Dandrifosse, 2000).

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

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

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

Algunas **prostaglandinas** presentes en la leche como la PGE<sub>1</sub> y PGE<sub>2</sub> tienen importantes propiedades antioxidantes.

## I. INTRODUCCION

### iii. Lípidos

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

La grasa en la leche materna se encuentra en forma de micelas. Las micelas de grasa están formadas por una tricapa externa formada por fosfolípidos, triglicéridos y lipasa y una pequeña cantidad de citoplasma del lactocito (Fig. I-20). Esta tricapa se forma debido a los procesos, primero de endocitosis (para la captación de lípidos desde el plasma materno hacia el interior del lactocito) y después de exocitosis al segregar la grasa hacia la luz del alveolo mamario (Abrahamse, 2012). En los repliegues de la tricapa micelar se encuentran importantes cantidades de lipasa (Michalski, 2013; Delplanque, 2015) que, al activarse en el tracto intestinal neonatal, contribuye a la hidrólisis de los triglicéridos contenidos en el interior del glóbulo graso. Esta hidrólisis facilita la absorción de ácidos grasos libres y glicerol. Además de facilitar la acción antiinfecciosa y antiinflamatoria que juegan los ácidos grasos libres de la leche materna en la protección antiinfecciosa del neonato (Pfaender, 2013; Delplanque, 2015).

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

La leche humana es también, rica en ácidos grasos poliinsaturados de la familia omega-3 como el ácido linolénico (precursor del ácido docosahexaenóico

## I. INTRODUCCION

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

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

### iv. Vitaminas

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

Durante los primeros años las necesidades de **vitamina A y carotenoides** son elevadas respecto a otras épocas de la vida y al nacimiento pero ni siquiera los recién nacidos a término tienen suficientes depósitos de vitamina A, cuyo aporte exógeno (a través de la leche materna) es imprescindible. La leche materna contiene vitamina A en forma de esteres de retinol (60% en forma de palmitato y estearato) y de carotenoides. Además de carotenoides precursores de vitamina A, se han aislado en la leche humana más de 30 carotenoides adicionales que aunque carecen de actividad pro-vitamina A poseen importantes cualidades como antioxidantes. Los **carotenos** presentes en la leche son fundamentalmente  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína/zeaxantina y licopeno y los tres primeros constituyen más del 50% (Gossage, 2002). Tanto carotenoides como

## I. INTRODUCCION

vitamina A son transferidas directamente a la glándula mamaria vía quilomicrones o lipoproteínas. Los niveles son más elevados en el calostro (Haskell, 1999) y disminuyen en las primeras semanas tras el nacimiento, aunque el descenso no es igual para todos los compuestos (Macías, 2001). El contenido medio se sitúa en  $236,7 \pm 121,9$  ng/mL de carotenoides,  $1,02 \pm 0,56$  µg/mL de vitamina A y  $0,08 \pm 0,01$  µg /mL de trans-retinol. No obstante, se ha descrito que el contenido de retinol y de carotenoides en la leche humana puede presentar grandes variaciones, cuando se comparan poblaciones de diferentes países (Canfield, 2003). Estas variaciones se atribuyen en gran parte a variaciones dietéticas (Olafsdottir, 2001).

Parece que a partir del primer mes postparto, los niveles se estabilizan incluso en mujeres malnutridas, pero en estas el contenido de vitamina A es inferior ( $50$  µg/dL frente a  $75-60$  µg/dL). Si la madre carece de fuentes dietéticas adecuadas de vitamina A, la elevada tasa de transferencia de la misma hacia la leche podría originar una deplección de sus propias reservas. Las mujeres multíparas y vegetarianas tienen niveles más elevados de carotenoides (Haskell, 1999) y también se ha descrito que es posible que si la madre aumenta la ingesta de alimentos ricos en vitamina A (por ejemplo hígado de bacalao, alimentos ricos en carotenoides o alimentos fortificados) es posible observar un aumento en los niveles de vitamina A de su leche (Olafsdottir, 2006; Mello-Neto, 2009).

El aporte de **vitamina E** de la leche materna es crítico para la protección antioxidante del neonato especialmente del pretérmino o del RN enfermo (Lee, 2011). Los niveles de vitamina E en neonatos son muy bajos al nacimiento (Baydas, 2002) y menores aún en los recién nacidos pretérmino que adolecen de una baja relación de vitamina E con respecto al contenido en lípidos y por tanto tienen una elevada susceptibilidad al daño oxidativo. Todos los tipo de isómeros de **tocoferoles y tocotrienoles** que constituyen la vitamina E se encuentran presentes en la leche humana. El  $\alpha$ -tocoferol de la leche se encuentra asociado a los lípidos de la membrana del glóbulo de grasa en cantidades tres veces superiores a las del interior del glóbulo lo que podría indicar la importancia de proteger dicha membrana de la oxidación (Tijerina-Sáenz, 2009). Es el compuesto más abundante

## I. INTRODUCCION

con niveles entre  $2,32 \pm 0,11 \mu\text{g} / \text{mL}$  y  $11,8 \pm 6,3 \mu\text{g} / \text{mL}$  (Macías, 2001) y representa el 76,5% del total. Además contiene  $\gamma$ -tocoferol (19,8%) y  $\delta$ -tocoferol (4,7%) (Szlगतys, 2012). Aunque la capacidad antioxidante total de la leche humana madura está directamente relacionada con su contenido en alfa-tocoferol, el resto de los compuestos tienen una importante actividad antioxidante, previenen la peroxidación lipídica (especialmente de los ácidos grasos saturados de la membrana celular), la oxidación de la vitamina A y los carotenoides, de muchas enzimas, de proteínas y del ADN (Romeu, 2006). Los niveles de vitamina E en leche materna están fuertemente relacionados con la ingesta materna de vitamina E (dieta o suplementos) y con los niveles de carotenoides. Algunos autores han observado que a lo largo de la lactancia la concentración de estos compuestos en la leche disminuye: los niveles de vitamina E en calostro son de 1.5 mg/dL, de 0.9 mg/dL en leche de transición y de 0.25 mg/dL en leche madura (Szlगतys-Sidorkiewicz, 2012).

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

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

La leche materna contiene alrededor de 4-5 mg/100 mL de **vitamina C**. Los niveles de vitamina C en la leche humana dependen de muchos factores entre otros de la ingesta materna de vitamina C y el estadio de lactancia. Se ha descrito que las madres, con dietas pobremente equilibradas o muy restrictivas pueden tener niveles de vitamina C en su leche demasiado bajos para asegurar un aporte

## I. INTRODUCCION

adecuado para sus hijos (Romeu, 2006). Y se ha observado que es posible aumentar los niveles de vitamina C en la leche con suplementos cuando los niveles séricos maternos son bajos. Sin embargo, por encima de un determinado nivel de saturación aumentar los suplementos no se traduce en un aumento de los niveles en leche. Todo ello sugiere la existencia de un mecanismo de regulación intrínseca para la transferencia de vitamina C desde la dieta a la leche, que prevendría cargas excesivas, probablemente para proteger al neonato de los efectos pro-oxidantes de cantidades elevadas de vitamina C (Hoppu, 2005).

El contenido medio de vitamina C en el calostro es 70 mg/L, en leche de transición de 60 mg/L y en la leche madura de 40 mg/L. Durante los primeros 6 meses de lactancia el contenido en la leche de la madre varía de 115 a 35 mg/L con una media de 50 mg/L y el contenido al final del primer año es un 10% menor (IOM, 2000). En lactantes con lactancia materna exclusiva desde el nacimiento hasta los 6 meses no se han observado niveles inadecuados de vitamina C y sí se ha descrito una relación inversa entre niveles elevados de vitamina C en la leche materna y el riesgo de atopia del lactante amamantado (Hoppu, 2005). La vitamina C de la leche ayuda al mantenimiento de la barrera natural frente a la infección, estimula las actividades fagocíticas y antibacterianas de los leucocitos, aumenta la producción de Igs y estimula la secreción de interferón (Li, 2009)

### v. Minerales

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

La relación **calcio/fósforo** en la leche humana es de 2:1 y en esta forma son ambos son fácilmente absorbidos por el lactante. Respecto al **hierro** presente en la leche humana, su biodisponibilidad es de aproximadamente el 50% como resultado

## I. INTRODUCCION

de la presencia de lactoferrina, la acidez del tracto gastrointestinal del lactante y la presencia de zinc y cobre. La lactosa y la vitamina C también favorecen su absorción (Mello-Neto, 2012). El contenido de **zinc** en la leche materna tampoco es elevado gracias a su elevada biodisponibilidad.

La leche humana es rica en **selenio** y los lactantes amamantados tienen niveles séricos de selenio más elevados que los alimentados con fórmula. Casi el 30% del selenio de la leche forma parte de la glutatión peroxidasa que con ella protege a sus ácidos grasos omega-3 de la oxidación. Pero además esta enzima constituye una excelente fuente de seleno-cisteína y tras ser captada a nivel intestinal, pasa a integrar las reservas antioxidantes del RN (Watts, 2009). De forma aislada el selenio puede ser considerado como un elemento traza en la leche humana al estar presente en cantidades mínimas, aunque los niveles de este mineral en leche humana parecen variar según la población estudiada, habiéndose descrito una concentración media de  $16,3 \pm 4,7$  ng/mL en España. Esta concentración en leche está claramente relacionada con la dieta materna y se ha observado que los niveles en leche aumentan si la madre suplementa su dieta con levadura enriquecida en selenio o seleno-metionina, consume pescado fresco, en mujeres con dietas ovo-lacto-vegetarianas o aquellas que habían enriquecido su alimentación con selenio (Valent, 2011). Los niveles de selenio en el suelo, influyen sobre los niveles de selenio en cereales y animales y a su vez en la ingesta materna. En países con suelos pobres en selenio, como Nueva Zelanda o Finlandia los niveles medidos en leche fueron menores que los niveles de mujeres procedentes de países con elevado contenido en selenio en su suelo, como EEUU, Japón o Venezuela (Zacara, 2000). Los niveles de este mineral, también varían a lo largo de la toma y la leche del final es más rica en selenio (16,7 ng/mL) que la del principio (15,7 ng/mL) (IOM, 2000). Las recomendaciones de aporte diario según el Instituto de Medicina de los EEUU (IOM) (IOM, 2000) serían de 15 mcg/mL (basada en la ingesta observada entre los lactantes amamantados (IOM, 2000).

Se conoce muy poco sobre las necesidades de **manganeso** de los lactantes, (Matos, 2009), en la leche humana, el 71% del mismo está asociado a las

## I. INTRODUCCION

proteínas del suero, el 11% a la caseína y el 18% a los lípidos. Los niveles de manganeso en la leche humana disminuyen a lo largo del primer mes, desde  $5,4 \pm 1,6$  mcg/dL en los primeros días a  $2,7 \pm 1,6$  mcg/dL en la leche del día 28. Se ha calculado una ingesta media de alrededor de 2 mg/día con una tasa de absorción del manganeso a partir de la leche humana ( $8,2\% \pm 2,9\%$ ) muy superior a la observada en otras leches (Lawrence, 2010).

### C. ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE HUMANA.

La leche humana posee una elevada capacidad antioxidante (CAT) y contiene sustancias antioxidantes que no aporta ningún otro alimento en ninguna otra época de la vida. Es así protegida de la oxidación y el enranciamiento de sus componentes, pero muy probablemente, ya que está destinada a ser consumida casi a la par que es producida, todo este contenido antioxidante tenga la misión de ayudar a proteger el estado oxidativo del recién nacido.

La CAT 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 RN, son capaces de actuar a nivel local, protegiendo el tracto respiratorio e intestinal (protección de las células epiteliales) y a nivel general (reducción espontánea del citocromo C) (Davis 2010, Davies 1995, Ezaki 2008).

Se han observado niveles mayores de CAT y de antioxidantes en calostro y se ha observado que disminuyen en los días y meses posteriores al nacimiento (Jansson, 1981; Chappell, 1985; Emmett, 1997; Gossage, 2002). Esto ha sido interpretado por algunos autores, como una respuesta del organismo materno a las necesidades más elevadas de su hijo, en los primeros días de vida (Huertas, 1997; Ochoa, 2003).

Con la leche el recién nacido recibe un aporte de antioxidantes mayor y más variado que el que cualquier dieta ofrece en otras épocas de la vida. Compuestos antioxidantes que en otras épocas de la vida dependen de la

## I. INTRODUCCION

producción propia, como enzimas, coenzimas, prostaglandinas o factores inhibidores de enzimas pro oxidantes, son aportados por la leche materna. Esta característica contribuye a la importantísima protección que el amamantamiento confiere, superior a la de cualquier sustituto (Friel, 2011). Este aporte, se adapta además a necesidades especiales, como demuestra el hecho de que la capacidad antioxidante y la presencia de algunos antioxidantes (alfa tocoferol y glutatión peroxidasa) son mayores en la leche de la madre de prematuros (Lindamrk-Mansson, 2000; Li, 2009.)

## D. NECESIDADES NUTRICIONALES DE LA MUJER DURANTE LA LACTANCIA.

En el momento actual se concibe como alimentación adecuada aquella que asegura no solo la ausencia de enfermedad por déficit, sino la que procura la mejor salud física y psíquica y previene enfermedades futuras. Y por ello, la dieta sana será aquella que contenga además de una cantidad determinada de macronutrientes y micronutrientes, una cierta cantidad de componentes funcionales como los antioxidantes, los compuestos prebióticos y los probióticos, entre otros (Silvestre, 2013). Existen pocos estudios en humanos sobre las necesidades nutritivas de la madre lactante y la mayoría de las recomendaciones se basan en extrapolaciones, pero en general se admite la necesidad de asegurar una ingesta adecuada de energía y de nutrientes con una dieta sana y diversificada antes y durante la lactancia, para asegurar un buen estatus nutricional capaz de hacer frente a las necesidades extras derivadas de la producción láctea y de asegurar la salud materna en próximos embarazos (Frigerio, 1991; Allen, 2005; Seise, 2009).

Por otra parte, muchas mujeres comen en la actualidad dietas poco sanas, por defecto (pobres en frutas, verduras, hortalizas o legumbres) o por exceso (demasiadas calorías, grasas y sal, exceso de grasas saturadas y de AGEs) que ponen en riesgo su estatus nutricional. Y esto genera situaciones de partida con

## I. INTRODUCCION

déficits nutricionales que se agudizarán en etapas de mayor exigencia como la gestación o la lactancia.

Durante la gestación y los primeros meses de **lactancia** la alimentación materna debe asegurar no solo las necesidades propias sino las derivados del crecimiento y desarrollo del nuevo ser. La dieta y el estatus nutricional de la madre pueden afectar la salud presente y futura de sus descendientes y una deficiencia o desequilibrio nutricional en estas etapas de la vida tendrá mayor impacto ya que afectarán la salud de dos seres (Silvestre, 2013).

Los consejos nutricionales han ido variando con el tiempo pero desde hace muchos años se reconoce que la capacidad materna para producir leche en cantidad y de calidad suficiente, para las necesidades de crecimiento y desarrollo del nuevo ser, es extremadamente resistente a la privación nutricional. Prácticamente todas las madres, salvo aquellas con malnutrición extrema, son capaces de producir cantidades adecuadas de leche sin que el aporte de macronutrientes y de la mayoría de los micronutrientes así como de las sustancias defensivas, se resienta de forma sustancial. Pero si la madre parte de una situación de reservas baja y el aporte nutritivo de la dieta durante la lactancia no es adecuado, es posible que su propio estado nutricional se resienta y que determinados contenidos de nutrientes en su leche se vean afectados, por ejemplo el yodo, el ácido docosahexaenóico, la colina (Creer, 2009) y algunas vitaminas (Allen, 2005).

En las tablas I-6 y I-7 puede verse la comparación de las recomendaciones para la mujer lactante en comparación con las de la mujer adulta (Silvestre, 2013). Aunque para otros nutrientes se han establecido Ingestas diarias recomendadas (nivel de ingesta capaz de asegurar las necesidades del 97% de la población) para la energía asegurar estos niveles de ingesta induciría un aumento de prevalencia de obesidad en la población. Por ello, se realizan "estimaciones de requerimientos" para cada grupo de edad y sexo basados a las estimaciones realizadas para diferentes índices de masa corporal (IMC) y el nivel de actividad física. Pero además, para el cálculo de las necesidades energéticas de la mujer lactante,

## I. INTRODUCCION

aparte de las necesidades propias de una mujer adolescente o adulta y de las necesidades extras derivadas de la producción de leche, hay que tener en cuenta la pérdida ponderal que ocurre tras el parto. En las últimas Recomendaciones de Ingesta (RDI) publicadas en EEUU (Otten, 2006) se contemplan necesidades energéticas estimadas de +330 Kcal en los primeros 6 meses post-lactancia y +400 en los siguientes meses sobre las necesidades estimadas para una mujer adulta de la misma edad, actividad física e IMC.

Hay pocos estudios sobre la ingesta dietética de las madres durante el embarazo y menos aún durante la lactancia (Seise, 2009) y las recomendaciones nutricionales para las mujeres en estas épocas se basan en extrapolaciones y en pocos estudios, la mayor parte de ellos observacionales (Pisciano, 2009). Pero se sabe que durante la lactancia, el estatus nutricional materno y/o la ingesta de determinados nutrientes, como las vitaminas del grupo B (excepto el ácido fólico), la vitamina A, el selenio y el yodo, se relacionan con los niveles en leche. Y, algunos de ellos, por ejemplo el yodo, son nutrientes esenciales durante la primera infancia cuyas necesidades no siempre son adecuadamente cubiertas por una dieta normal, y en algunos países existen políticas de enriquecimiento de suelos o de alimentos (sal yodada) (Pallás, 2014).

La protección del estatus oxidativo la realiza la madre aportando antioxidantes al feto a través de la sangre de cordón en la etapa intrauterina y con la leche materna al lactante, tras el nacimiento. El aporte de antioxidantes de todo tipo a través de la leche materna es importante mientras no existe otro tipo de aporte exógeno y hasta que el sistema propio alcanza un adecuado nivel de madurez. Por ello es esencial evitar en la madre una ingesta pobre o un déficit previo de antioxidantes por la influencia que ello pudiera tener en el lactante que pudiera consumir menos de la cantidad requerida para un desarrollo adecuado (Erdem, 2012; Allen, 2005). Aunque hay más estudios en recién nacidos pretérmino, los estudios en lactantes normales son muy escasos, pero es muy probable que un estatus oxidativo deficiente de la madre pueda ser transmitido a su progenie (Hoppu, 2005). Por otra parte, las necesidades maternas de antioxidantes que permitan

## I. INTRODUCCION

asegurar un aporte adecuado en su leche, también están sujetas necesariamente a la capacidad de almacenamiento de cada sustancia y al desgaste que las circunstancias propias de cada mujer impongan sobre las mismas. Sin olvidar la prioridad que el organismo materno pueda asignar a la presencia en leche de determinados nutrientes (incluidos los antioxidantes) aún que ello suponga un detrimento de las reservas maternas.

En algunas situaciones como en el caso de la vitamina C, se ha observado que su presencia en la leche puede proteger de la atopia a los RN en riesgo. Sin embargo, muchas de las madres de estos niños son alérgicas y realizan dietas restrictivas, por lo que son precisamente estos lactantes los que podrían estar más expuestos a posibles déficits nutricionales.

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

La mayoría de los autores y organismos internacionales coinciden en reconocer que la lactancia es una etapa de mayor demanda de nutrientes, destinada a la producción de la leche, aunque a la hora de determinar las necesidades de ingesta hay que tener en cuenta las reservas acumuladas durante la gestación y las adaptaciones metabólicas por medio de las que el organismo materno realiza un aprovechamiento más eficiente de los nutrientes de los alimentos (Otten, 2006). Sin embargo este es un campo en el que hay muy pocos datos debido a la escasez de investigación (Silvestre, 2007), especialmente en el campo de los lactantes a término.

## I. INTRODUCCION

### 4. PROPIEDADES NUTRITIVAS Y APOORTE ANTIOXIDANTE DE LA CERVEZA.

#### A. BREVE HISTORIA DE LA CERVEZA.

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida en el mundo, la tercera bebida más popular después del agua y el té y, probablemente, la bebida fermentada más antigua conocida. (Arnold, 2005; Nelson, 2005; Abingdon, 2004; Rudgley, 1993). Su consumo se remonta a miles de años antes de Cristo en toda la cuenca mediterránea. El Código de Hammurabi recoge leyes para la producción y distribución de la cerveza (Black, 2004) y se han encontrado restos de cerveza en jarras de la antigua Sumer (Rudolph, 1992). Ninkasi era la diosa sumeria de la cerveza y era considerada la cerveza misma y la jefa de los cerveceros (Homan, 2004). En Sumer las mujeres eran las que fabricaban la cerveza y por ello eran también las taberneras. También los egipcios consideraban que la cerveza era un bien sagrado, la diosa Tjenenet (a la que se presentaba cerveza como ofrenda) era la diosa de la cerveza y se atribuía a la diosa Osiris la fórmula para su fabricación. La cerveza era fabricada por las mujeres con trozos de pan triturado, que eran macerados y dejados fermentar al sol en vasijas de barro y tras un filtrado final constituían una bebida probablemente más consistente y nutritiva que la actual y considerada buena para niños y adultos era considerada tan importante como el pan en la dieta. Fabricaban diferentes tipos de cerveza y su comercialización era monopolio del faraón, se bebía con paja para filtrar así las impurezas ¡y los insectos! y era considerada una bebida nutritiva y sana (Hornsey, 1993).

En España, se han hallado indicios de consumo de cerveza en el valle de Ambrona (Soria) en el 4400 a.C. y en Genó (Lérida) en 1100 a.C. (Calleja-Colorado, 2013). Plinio "El viejo" menciona la "celia" o "cerea" en su *Historia Naturalis* (Plinio Segundo año), Lucio Anneo Floro describen como los íberos se emborrachaban antes de la batalla de Numancia contra los romanos (Olalla, 2001) y Polibio la menciona como bebida de un rey íbero (Balasch, 1997). Pero en el Imperio Romano

## I. INTRODUCCION

la cerveza se consideraba una bebida de bárbaros y tras la invasión romana de España, su consumo es abandonado durante siglos en nuestro país.

Aunque los romanos no eran aficionados a la cerveza, sus escritos describen su consumo en los pueblos de Bretaña, en Britania y en las poblaciones del Norte, donde el clima frío favorece su conservación. Cuando se producen las invasiones bárbaras, la cerveza vuelve a adquirir protagonismo en las zonas del antiguo imperio romano y en la Edad Media la cerveza es fabricada en monasterios de todo el Norte de Europa. Hildegar de Bingen (1098-1179) abadesa benedictina, filósofa, herbalista y escritora aconseja añadirle lúpulo por sus propiedades antisépticas (Small, 1999). Los visigodos son los primeros en hacerlo por sistema porque así la "cerevisia" es más duradera y su uso se generaliza a partir del siglo XIII. En la Edad Media, el contenido alcohólico de la cerveza y su baja graduación la hacen muy apreciada como fuente de líquido menos contaminado que otros y por ser considerada alimento saludable y conveniente.

En España en la Edad Media era común el consumo de "celia", bebida derivada de la fermentación del germen de trigo diluido con vino suave (citado por San Isidoro en sus "Etimologías"). Carlos V, establece la primera "cervecería" en el Monasterio de Yuste durante su retiro y en 1544 se instala la primera cervecería de las Américas en Chalco (Méjico) (Olalla, 2001). A partir del siglo XIX, la aparición de neveras y cámaras de refrigeración permite extender la fabricación de la cerveza y su consumo como bebida refrescante por todo el mundo.

## B. ELABORACIÓN DE LA CERVEZA

La cerveza se produce básicamente por fermentación de los azúcares resultantes de la sacarificación del almidón de cebada y otros cereales, con lo que se obtiene una bebida burbujeante de bajo contenido alcohólico. Tras ser lavada, y ya limpia de impurezas la cebada es sometida a un proceso de malteado, en el que tras dejarla germinar durante unos días a temperaturas suaves (se producen enzimas que luego participan en el proceso de fermentación) es secada y tostada. La malta así obtenida se tritura y se mezcla con agua caliente para obtener el

## I. INTRODUCCION

mosto que posteriormente es filtrado y ya limpio de impurezas (bagazo), se aromatiza con flores de lúpulo (que le confieren el gusto amargo además de propiedades antisépticas) y en ocasiones otras plantas o frutas. Esta mezcla está lista entonces para la fermentación con levaduras seleccionadas.

Para la producción de la cerveza se utilizan 2 tipos de levadura. El uso de levaduras altas (quedan en la espuma durante la fermentación) producen cervezas turbias y más afrutadas llamadas "Ale". Cuando se usan levaduras "bajas" éstas se hunden al final del proceso (por eso el nombre de "bajas") y arrastran al fondo las partículas en suspensión. De esta manera se obtienen cervezas menos afrutadas, más cristalinas y de mayor duración (por haber empezado a producirse en Pilsen son llamadas Pilsener en Alemania). Las cervezas "lager" son cervezas cristalinas, claras y suaves que se beben frías (Bamforth, 2004). Dependiendo de las mezclas de cereal y del proceso de tostado de la malta se obtienen cervezas "bitter", muy amargas (con malta poco tostada), "mild" más suaves (cebada más tostada y menos lúpulo) o "stout" (fabricadas con malta muy tostada tienen cierto aroma a quemado). El tipo de agua, los recipientes y las levaduras, así como algún otro aditivo, también contribuyen a las propiedades organolépticas y el contenido nutricional de las distintas cervezas.

## C. COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LA CERVEZA.

La cerveza contiene compuestos que derivan de los ingredientes utilizados en su fabricación: malta, lúpulo, agua y levadura y de la interacción entre ellos, tras los procesos de malteado, fermentación y filtrado entre otros.

El contenido calórico varía de 40 a 45 Kcal/100 mL. En los análisis nutricionales se han aislado más de 400 componentes diferentes (Sendra, 1999), entre los que cabe destacar por su poder antioxidante: el ácido fólico, vitaminas del grupo B, compuestos polifenólicos y melanoidinas (Tabla I-5).

El 90% de la cerveza es **agua** y por lo tanto, las características del agua que se utilice influyen en el pH y las características de la malta, del mosto y de la cerveza.

## I. INTRODUCCION

Contiene una cantidad variable de **alcohol** según el tipo de cerveza. Suele oscilar entre 4 y 7 grados, aunque algunas cervezas llegan a 15°, y en las cervezas sin alcohol el contenido es prácticamente inapreciable (0,6-0,02°) (Bamforth, 2004). El alcohol de la cerveza, influye en sus características organolépticas, en su poder relajante, en la trasmisión de aromas en boca y nariz y en la formación de la espuma.

El contenido en **minerales** de la cerveza, aunque variable, según el tipo, oscila entre 0,5 a 2 g/L con cantidades significativas de K, Mg, Na y Calcio y Silicio. También contiene, aunque en cantidades mucho menores, manganeso, cobre, hierro y cinc.

El contenido en **carbohidratos** varía según el tipo con un contenido medio de 3 a 5 %. Tras la acción de las maltasas de la levadura sobre el almidón de la malta, se obtiene alrededor de un 75-80% de maltodextrinas y el resto son monosacáridos (ribosa, arabinosa, xilosa, glucosas, fructosa o galactosa), disacáridos (maltosa e isomaltosa) y trisacáridos (panosa, isopanosa y maltotriosa). También contiene en pequeñas cantidades glicerol y mioinositol así como beta-glucanos que estabilizan la espuma. Las cervezas "light" se producen tras dejar fermentar prácticamente todo su contenido en carbohidratos, con ello se obtiene una bebida con mayor contenido alcohólico que luego se diluye para conseguir el contenido habitual en alcohol, obteniéndose así una bebida menos calórica.

## I. INTRODUCCION

Tabla I-5. Principales componentes de la cerveza					
Compuesto	(en mg/L salvo expresado de otro modo)		Compuesto	(en mg/L salvo expresado de otro modo)	
Alcohol	3,93	g/100g	Pentosanos	60	mg/L
Extracto real	4,15	g/100g	β-Glucanos	350	mg/L
Agua	919	g/L	Proteínas	5	g/L
CO <sub>2</sub>	5	g/L	Histidina	36	mg/L
Carbohidratos totales	28	g/L	Isoleucina	34	mg/L
Glucosa	150	mg/L	Leucina	55	mg/L
Fructosa	30	mg/L	Lisina	16	mg/L
Sacarosa	5	mg/L	Metionina	2	mg/L
Maltosa	1.430	mg/L	Fenilalanina	77	mg/L
Maltotriosa	1.930	mg/L	Triptofano	20	mg/L
Maltotetraosa	3.360	mg/L	Valina	73	mg/L
Maltopentaosa	1.330	mg/L	Arginina	72	mg/L
Maltohexaosa	1.150	mg/L	Prolina	357	mg/L
Maltoheptaosa	1.090	mg/L	Acido Aspartico	28	mg/L
Maltooctaosa	1.220	mg/L	Serina	19	mg/L
Maltononaosa	1.590	mg/L	Acido γ-amino butírico	73	mg/L
Maltodecaosa	1.750	mg/L	Acido Glutámico	40	mg/L
Maltoundecaosa	920	mg/L	Glicina	31	mg/L
Maltododecaosa	640	mg/L	Alanina	103	mg/L
Maltotridecaosa	760	mg/L	Tirosina	76	mg/L
Maltotetradecaosa	1.020	mg/L	Cisteína	12	mg/L
Maltopentadecaosa	880	mg/L	Cistina	6	mg/L
Maltohexadecaosa	950	mg/L	Polifenoles totales	172	mg/L
Maltohepatdecaosa	800	mg/L	Dióxido sulfúrico	3,7	mg/L
Maltooctadecaosa	1.130	mg/L	Putrescina	130	µg/L
Otras dextrinas	5.490	mg/L	Tiramina	1,69	mg/L
Potasio	493	mg/L	Histamina	315	µg/L
Sodio	30	mg/L	Purinas	134	mg/L
Calcio	34	mg/L	Pirimidinas	144	mg/L
Magnesio	107	mg/L	Tiamina	33	µg/L
Fosforo	308	mg/L	Riboflavina	410	µg/L
Cobre	0,07	mg/L	Piridoxina	650	µg/L
Hierro	0,09	mg/L	Acido Pantoténico	1.632	µg/L
Manganeso	0,17	mg/L	Niacina	7.875	µg/L
Zinc	0,06	mg/L	Biotina	13	µg/L
Silicona	107	mg/L	Vitamina B12	0,1	µg/L
Sulfato	176	mg/L	Acido Fólico	82	µg/L
Cloro	179	mg/L	Meso-inositol	10,1	mg/L
Nitrato	23	mg/L	Colina	1,1	mg/L

Adaptado de Bamforth, 2004

## I. INTRODUCCION

Un litro de cerveza contiene habitualmente entre 1,9 y 6,3 g de **compuestos nitrogenados**. Esta fracción, constituye entre 0,15 - 0,7% del total y contiene proteínas, poli péptidos, aminoácidos y ácidos nucleicos. Pueden proceder directamente de los cereales originales y de la levadura o ser el resultado de la degradación y transformación de los mismos durante la elaboración de la cerveza. Los aminoácidos presentes en el mosto, sirven como nutrientes a las levaduras; otros tienen gran influencia sobre el resultado final, como en el caso del ácido glutámico. Sólo permanece en la cerveza entre el 30-50% del contenido del mosto (Sendra, 1999). Esta fracción influye en el aroma, el color, el sabor, la formación y estabilidad de la espuma y la turbiedad (Sendra, 1999, Bamforth, 2004).

La cerveza es de pH **ácido** (entre 4,7 en las tostadas y 4,1 en las rubias) (Bamforth, 2004). Los ácidos de la cerveza provienen de la malta y la actividad de la levadura y son principalmente ácido acético (80%) (Bamforth, 2004) y otros ácidos orgánicos (málico, cítrico, láctico, oxálico, succínico, fumárico, glicólico, pirúvico, carbónico, láctico y fórmico) que contribuyen al aroma, el sabor y la estabilidad de cada cerveza (Sendra, 1998).

El contenido **lipídico** de la cerveza es escaso. Fundamentalmente ácidos grasos (0,33-0,76 mg/L), mono, di y triglicéridos (hasta 0,4 mg/L) y trazas de esteroides y fosfolípidos, su contenido afecta a la formación de espuma y al aroma (Sendra, 1998).

La cerveza contiene principalmente **vitaminas** del grupo B y ácido fólico que proceden de la cebada, de las levaduras y de la acción de la germinación y sobreviven al tostado (Sendra, 1999; Bamforth, 2004). Las cervezas en las que tras el embotellado se conservan restos de levadura (artesanales) conservan más vitaminas. Aunque parte (y en diferentes proporciones según la vitamina) se pierde en los procesos posteriores de mouturación, filtrados y cocciones e incluso durante el embotellado, el aporte de las mismas (especialmente el ácido fólico) no es despreciable cuando se estudia la densidad de estos nutrientes respecto al

## I. INTRODUCCION

contenido en otros alimentos (Tabla I-6). Algunas cervezas contienen vitamina C añadida para protegerlas de la oxidación.

mg/1000 Kcal	Cerveza común	Cereales	Carne	Frutas
Tiamina (B1)	0,005	0,100	0,05	0,08
Riboflavina (B2)	0,033	0,033	0,10	0,03
Niacina (B3)	0,820	0,560	3,30	0,69
Piridoxina (B6)	0,070	0,040	0,10	0,19
Cobalamina (B12)		0,020	0,33	0
Ac. Pantoténico	0,190	0,190		
Biotina	0,002			
Ac. Fólico	7,400	6,900	4,10	22,2

Adaptado de Bamforth, 2004.

La cerveza tiene un contenido variado de sustancias aromáticas que también le da sabor. Las que proceden del malteado son los productos originados en las reacciones de Maillard y son fundamentalmente, compuestos N-heterociclicos como pirazinas y pirroles. Otros derivan del mosto, como la S-metilmetionina, del lúpulo como las isohumulonas que le dan el sabor amargo, o de hierbas añadidas (alfa-terpinol). De la fermentación resultan ésteres que le dan el aroma afrutado a muchas cervezas.

Los compuestos **fenólicos**, provienen mayoritariamente de la malta y en menor medida del lúpulo y le dan aroma y sabor y propiedades antioxidantes (Sendra, 1999). Algunos de los fenoles de la cerveza además de darle astringencia, color o aroma, pueden ser responsables, al menos en parte, de su turbidez (González, 2001). El contenido final en **polifenoles** es variable pero en general los compuestos predominantes son proantocianidinas, catequinas, ácidos fénicos y quercetina (González, 2001). Algunos autores, han demostrado los efectos de protección frente a la oxidación de lípidos y proteínas (González, 2001) o evitando el daño oxidativo contra el ADN (Valls, 2005) de la fracción de flavonoide. Los polifenoles de la cerveza pueden inhibir la oxidación de las LDL (Miranda, 2000) y las

## I. INTRODUCCION

chalconas la peroxidación lipídica (Rodríguez, 2000). Parece que la capacidad antioxidante en relación al contenido en polifenoles de un determinado alimento o bebida está más relacionada con el tipo que con la cantidad total de los mismos (Gorinstein, 2000; Bamforth, 2004).

La cerveza contiene cantidades no despreciables de **melanoidinas**, de peso molecular entre 5.000 y 100.000 Dalton, que se forman durante el tostado a través de reacciones de Maillard entre grupos amino de grupos polipeptídicos y grupos aldehído de los azúcares (Vermin, 1982; Namiki, 1988; Valls, 2005).

Vitaminas, polifenoles y melanoidinas contribuyen también a la capacidad antioxidante total de la cerveza (Tabla I-7) (González, 2001).

Polifenoles totales	172 mg/L
Antocanogenos	46 mg/L
Catequina	5 – 55 mg/L
Epicatequina	9 – 24 mg/L
Rutina	1 – 6 mg/L
Quercetina	5 – 125 mg/L
Acido clorogénico	2 – 20 mg/L
Acido cafeico	2 – 20 mg/L
Acido quínico	1 – 5 mg/L
Acido <i>p</i> -Cumárico	1 – 7 mg/L
Acido Ferúlico	2 – 21 mg/L
Acido Sinápico	1 – 20 mg/L
Kampferol	5 – 20 mg/L
Miricetina	1 mg/L
Acido Gálico	5 – 29 mg/L
Acido <i>p</i> -Hydroxybenzóico	5 – 20 mg/L
Isohumulonas	10 – 40 mg/L
Dióxido de sulfuro	3,7 mg/L
Putrescina	130 µg/L
Tiramina	1,69 mg/L
Histamina	315 µg/L
Purinas	134 mg/L
Pirimidinas	144 mg/L
Adaptado de Bamforth, 2004	

## I. INTRODUCCION

### D. COMPOSICIÓN Y PROPIEDADES NUTRICIONALES DE LA CERVEZA SIN ALCOHOL.

Según la legislación española, se entiende por cerveza sin alcohol, aquella cuya graduación alcohólica es menor del 1% en volumen. Este bajo contenido en alcohol se consigue, mediante la extracción del alcohol (a través de la evaporación, la rectificación al vacío o la ósmosis inversa) o mediante la elaboración directa de cerveza con menor contenido alcohólico lo que se consigue restringiendo la actividad fermentativa de la levadura (con el uso de un mosto con cantidades muy bajas de azúcares fermentables o limitando el tiempo de contacto (a bajas temperaturas) entre levadura y mosto) (Mollenhauer, 1992; Bamforth, 2004).

La cerveza sin alcohol es una bebida eminentemente rica en agua y pobre en calorías, proteínas, lípidos e hidrocarburos que es pobre en sodio (44 mg/L de media), contiene calcio (aproximadamente, 40 mg/100 mL) y cantidades no despreciables de folatos (5 µg/100 mL aproximadamente) y sustancias antioxidantes como polifenoles y melanoidinas (Tabla I-8 y I-9).

<b>Tabla I-8. Composición de las cervezas sin alcohol españolas</b>	
	Contenido medio
Kcal/100 mL	14
Proteínas (g/100 g)	0,06 ± 0,27
Carbohidratos (g/100 g)	0,33 ± 2,35
Sustancias reductoras (mg/L)	29,93 ± 137,98
Ca (mg/L)	39,03 ± 14,38
Mg (mg/L)	71,17 ± 30,80
K (mg/L)	301,33 ± 96,840
Na mg/L)	44,67 ± 31,16
Alcohol (%)	0,28 ± 0,14
B1 (mg/100 mL)	0,010 ± 0,000
B2 (mg/100 mL)	0,020 ± 0,010
Folatos (µg/ 100 mL)	4,97 ± 2,09
Tomado de Martínez-Álvarez, 2001.	

En los estudios realizados por González y Valls no se observaron diferencias significativas en el contenido medio de fenoles cuando se compararon cervezas

## I. INTRODUCCION

rubias, cervezas negras y cervezas sin (Tabla 1-9) ni tampoco en la capacidad antioxidante total (González, 2001) (Tabla I-10).

Tipo de cerveza	Aox (mg/mL)	PPT (mg/mL)	PRO (mg/mL)	Catq (mg/mL)	Melanoidina (mg/mL)
Sin alcohol	0,87 ± 0,03	2.257 ± 138	1.749 ± 4	337 ± 12,2	5,77 ± 1,2
Con alcohol	1,49 ± 0,1	2.892 ± 133	1.936 ± 22,8	393 ± 17,2	6,11 ± 2,4

Aox: Actividad antioxidante; PPT: polifenoles totales; PRO: procianidinas; Catq: catequinas.  
Tomado de Valls, 2005

	Cerveza Rubia	Cerveza negra	Sin alcohol
Ac. Gálico (mg/L)	9,14	7,71	9,17
Ac. Ferúlico (mg/L)	7,68	7,95	4,00
Ac. Siríngico (mg/L)	4,69	5,13	7,61
Catequina (mg/L)	6,66	2,74	2,67
Epicatequina (mg/L)	3,23	2,73	1,42

Adaptado de González, 2001

## E. CONSUMO DE CERVEZA Y SALUD.

Se ha descrito que la capacidad antioxidante de 1 vaso de vino tinto (125 mL) equivale a 12 vasos de vino blanco, 2 tazas de te, 3,5 vasos de zumo de grosella y 3,5 vasos de cerveza (500 mL) (Paganga, 1999). Este poder antioxidante es atribuido principalmente a su contenido en polifenoles (Bourne, 2000). Desde un punto de vista nutricional, la cerveza contiene más proteínas y vitaminas del grupo B que el vino. Su actividad antioxidante parece similar a la del vino aunque sus antioxidantes específicos (procedentes del lúpulo y la cebada) sean distintos a los de la uva (Denke, 2000).

El aporte de ácido fólico podría tener efectos beneficiosos en la protección frente a la enfermedad cardiovascular (Riddell, 2000), así como el contenido en Xantohumol (constituyente del lúpulo presente en la cerveza) que tiene un efecto

## I. INTRODUCCION

inhibitorio sobre la producción de triglicéridos (Tabata, 1997) y es activo frente a la oxidación de las LDL (Miranda, 2000). Además los compuestos fenólicos aislados de las cervezas (con y sin alcohol) han mostrado capacidad antioxidante capaz de proteger a ratones de la hepatotoxicidad de la Adriamicina (González, 2001; Valls, 2008).

Koletzko y su equipo describen un aumento de producción y de mayor potencia del reflejo de eyección de leche, en las madres que consumieron cerveza. Estos efectos fueron atribuidos a un compuesto polisacárido de la cebada así como a un determinado fito-estrógeno procedente del lúpulo. Además del efecto relajante atribuido no sólo al lúpulo sino también al contenido alcohólico (Koletzko, 2000).

### III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

## I. JUSTIFICACION



## II. JUSTIFICACIÓN

## I. JUSTIFICACION

## II. JUSTIFICACIÓN.

La dieta y el entorno, no sólo la genética, tienen importantes influencias sobre nuestro estado de salud ya desde el periodo intrauterino y en la infancia más temprana. Tanto por exposición exógena a tóxicos como por la producción endógena, y consustancial con nuestro metabolismo oxidativo, de radicales libres, desde el nacimiento debemos lidiar con la amenaza de la oxidación. Los radicales libres en pequeñas cantidades son necesarios y cumplen funciones importantes y necesarias sin embargo, su gran reactividad hace necesario un estricto control de su producción que evite situaciones de estrés oxidativo. El estrés oxidativo es el resultado de un exceso de oxidación que daña biomoléculas y altera las funciones de estructuras como la membrana celular (peroxidación de los fosfolípidos), el citoplasma (desnaturalización de las proteínas), el sistema mitocondrial (alteración de sistemas enzimáticos o del ARN) o el núcleo (alteración del ADN). Estos daños participan de modo sustancial en el envejecimiento celular y muchas enfermedades crónicas. El control, neutralización y reparación de moléculas oxidadas es llevado a cabo por el sistema antioxidante que consiste en un complejo entramado de compuestos diversos, algunos de los cuales necesitan ser repuestos por vía exógena (la alimentación). Las necesidades de reposición varían con las diferentes situaciones vitales (crecimiento, enfermedades, exposición a radiaciones o tratamientos con xenobióticos).

En la etapa neonatal, el nacimiento, los primeros movimientos respiratorios, y el crecimiento y la maduración de órganos y sistemas suponen una carga oxidativa considerable (que se incrementa en casos de enfermedad o prematuridad o exposición a contaminantes medioambientales). Pero además en esta etapa y los primeros meses de la vida el ser humano adolece de un sistema antioxidante propio inmaduro, más cuanto menor es la edad gestacional al nacimiento.

La leche materna, el alimento de especie en esta época de la vida es

## I. JUSTIFICACION

fuentes de numerosas moléculas bioactivas con funciones diversas, y entre ellas muchas con actividad antioxidante pudiéndose afirmar que la leche humana es quizá el alimento más completo desde el punto de vista de aporte antioxidante. Porque además de moléculas presentes en otros alimentos y quizá para compensar la inmadurez del organismo neonatal la leche humana contiene cantidades nada despreciables de enzimas antioxidantes (como la superóxido dismutasa, la catalasa, la glutatión peroxidasa) y sustancias (coenzima Q<sub>10</sub>) que en comparación con otras épocas de la vida son sintetizados en cantidades escasas en el interior celular. Diversos estudios muestran la superior capacidad antioxidante de la leche humana frente a la de los sucedáneos y se ha demostrado que los recién nacidos tienen una mejor situación REDOX y sufren menos daños oxidativos cuando son alimentados con leche materna.

Pero además, la leche materna parece adaptarse también a las necesidades especiales de algunos neonatos como lo demuestra el hecho de que la capacidad antioxidante y la concentración de algunos antioxidantes en la leche son mayores en la leche de las madres de prematuros (cuyas necesidades son mayores). También se ha observado que el contenido en antioxidantes y la capacidad antioxidante total de la leche humana, son mayores en el calostro y menores en la leche segregada por la madre en los días y meses posteriores. Aunque esto podría ser la respuesta a una mayor necesidad inicial de defensas antioxidantes, también es posible que sea el resultado del agotamiento de las reservas maternas, como consecuencia de un aumento de demanda (reparación de los daños oxidativos propios tras el parto) y/o de una inadecuada reposición.

El estado nutricional de la madre influye de forma diferente en el contenido de nutrientes de su leche. Por ejemplo los niveles de caseína, lactosa, lactoferrina, o hierro son muy estables pero otros como los ácidos grasos y las vitaminas del grupo B sí sufren importantes variaciones en relación con la dieta materna y su estado nutricional. Para otros las variaciones solo aparecen tras la suplementación en situación materna de déficit nutricional para el compuesto (vit. C o vit. A).

La cerveza con más de 2000 compuestos diferentes y con una importante

## I. JUSTIFICACION

actividad antioxidante es popularmente conocida en nuestra tradición como una bebida de importantes efectos beneficiosos para la madre que amamanta, además de poder estimular la secreción de prolactina. Aunque su contenido en alcohol la hace desaconsejable en la dieta de la madre que amamanta, este inconveniente no lo tiene la cerveza sin alcohol cuyo contenido antioxidante es similar. Y aunque se ha publicado mucho sobre la importancia del aporte antioxidante de la cerveza en la dieta, no hay estudios sobre los efectos de la ingesta de cerveza sin alcohol en la mujer durante la lactancia.

### Conociendo pues:

- que el recién nacido está sometido a un importante estrés oxidativo;
- la importancia del metabolismo REDOX en la génesis de enfermedades del adulto;
- las variaciones de composición que puede experimentar la leche materna en relación a la dieta;
- la riqueza en antioxidantes de la cerveza sin alcohol;
- que no existen en la literatura estudios que comprueben la influencia de la ingesta de cerveza sin alcohol sobre la capacidad antioxidante de la leche humana y su influencia en el estado redox materno infantil

### Se plantea:

Explorar la posibilidad de mejorar la capacidad y el contenido antioxidante de la leche humana mediante la adición de cerveza sin alcohol a la dieta materna habitual además de estudiar la repercusión que esto pudiera tener sobre el estado oxidativo del lactante.





### III.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

Para comprobar la hipótesis que sigue, este trabajo se plantea un objetivo principal y objetivos intermedios.

#### HIPÓTESIS

Este estudio fue realizado para comprobar la siguiente hipótesis:

**¿Puede la suplementación de la dieta materna con cerveza sin alcohol, durante la lactancia, modificar sustancialmente la capacidad antioxidante de la leche materna?**

Y, en caso de ser positiva esta respuesta,

**¿En qué sentido la modifica, y cómo repercuten estas modificaciones en el recién nacido?**

#### OBJETIVO PRINCIPAL

**Valorar si la suplementación de la dieta materna con una bebida rica en antioxidantes influye en el nivel del estado oxidativo de la leche materna.**

#### OBJETIVOS

1. Evaluar la calidad y el contenido de la dieta de las mujeres lactantes.
2. Evaluar la capacidad antioxidante total de la leche humana.
3. Evaluar la evolución de la capacidad antioxidante de la leche humana a lo largo del primer mes posparto.
4. Evaluar el contenido en antioxidantes de la leche humana.

5. Evaluar la evolución del contenido en antioxidantes de la leche humana a lo largo del primer mes posparto.
6. Analizar la influencia de la adición de cerveza sin alcohol como suplemento en la dieta de la madre lactante, sobre la capacidad antioxidante de su leche.
7. Analizar la influencia de la cerveza sin alcohol como suplemento en la dieta de la madre lactante, sobre el contenido en antioxidantes de su leche: polifenoles y coenzima Q10.
8. Analizar la influencia que sobre el estado oxidativo del recién nacido amamantado tiene la adición de cerveza sin alcohol en la dieta de su madre.

#### IV. MATERIAL Y METODOS



#### IV. MATERIAL Y MÉTODOS

#### IV. MATERIAL Y METODOS

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1. DISEÑO.

#### A. TIPO DE ESTUDIO.

**Estudio de cohortes, prospectivo, analítico.** Se realizó el seguimiento desde el primer día postparto hasta el final del primer mes, a 2 grupos de madres (grupo control y grupo experimental) cuyo parto tuvo lugar en el Hospital Dr. Peset, que habían decidido amamantar a sus recién nacidos, en exclusiva desde el nacimiento y, al menos, durante el primer mes postparto.

Se ofreció la participación a todas las mujeres, que ingresaron en la Maternidad del Hospital Dr. Peset desde agosto 2011 a diciembre 2012. Se incluyeron todas las que cumplían los criterios de inclusión y aceptaron participar tras recibir la información sobre el estudio (ver requisitos ética).

No se realizó asignación al azar. Las mujeres fueron asignadas consecutivamente a los grupos control y experimental. Cuando alguna mujer expresó su desagrado por la cerveza, fue asignada al grupo control y se asignó la siguiente participante al grupo de intervención.

#### B. SUJETOS DE ESTUDIO.

Mujeres sanas, con recién nacidos sanos, de la Maternidad del Hospital Dr. Peset de Valencia (índice de partos cercano a los 2.500 al año, con un porcentaje de lactancia materna inicial del 82 %).

**Grupo control:** 40 mujeres y sus recién nacidos, con lactancia materna exclusiva, con dieta variada normal sin restricciones salvo suplementos vitamínicos, café, chocolate o té.

**Grupo experimental:** 40 mujeres sanas, con lactancia materna exclusiva al

## IV. MATERIAL Y METODOS

menos durante el tiempo de seguimiento dieta variada normal sin restricciones salvo suplementos vitamínicos, café, chocolate o té y suplemento con 660 mL/día (2 latas) de cerveza sin alcohol durante el primer mes postparto.

### i. Criterios de inclusión.

- a. Mujeres sanas, no fumadoras, con estado nutricional normal y sin restricciones dietéticas específicas.
- b. En periodo puerperal temprano (< 24 horas postparto) tras un parto normal en el Hospital Dr. Peset de Valencia.
- c. Madres de recién nacidos sanos, a término, con un test de Apgar > 8 en el primer minuto y  $\geq 9$  a los 5 minutos, con peso al nacimiento adecuado para la edad gestacional, amamantados en exclusiva tras el nacimiento y durante todo el seguimiento.
- d. Mujeres que entendieran y hablaran español y aceptaran las condiciones del estudio:
  - i. No tomar chocolate, café ni té ni suplementos vitamínicos excepto yodo, durante el tiempo del estudio.
  - ii. Acudir a los controles del programa de salud del Niño en el Centro de Salud de Fuente de San Luís durante el primer mes y consultar las dudas sobre lactancia en la consulta de lactancia de dicho centro, durante el periodo de seguimiento.

### ii. Criterios de exclusión.

- a. Enfermedad materna, parto distócico o cesárea,
- b. Necesidad de ingesta de medicación o vitaminas durante el seguimiento,
- c. Necesidades dietéticas especiales,
- d. Problemas neonatales:
  - i. Enfermedad neonatal,

#### IV. MATERIAL Y METODOS

- ii. Prematuridad,
- iii. Peso al nacimiento inferior a 2500 g.
- iv. Haber necesitado oxígeno suplementario, tras el nacimiento,
- v. Abandono de la lactancia materna exclusiva antes del primer mes,
- vi. No acudir a los controles de la consulta de lactancia en los primeros días tras el nacimiento, a los 15 días o al mes de vida.

#### C. TAMAÑO MUESTRAL.

Realizamos el cálculo del tamaño muestral en base a la diferencia esperada en la capacidad antioxidante total de la leche materna para un error alfa del 20% y un error beta del 10%. Se obtuvo un tamaño muestral necesario de 30 madres en cada grupo. Decidimos incluir a 40 madres en cada grupo calculando pérdidas durante el seguimiento.

#### D. REQUERIMIENTOS ÉTICOS.

Al invitarlas a participar, las mujeres y sus parejas fueron informadas de las condiciones y posibles inconvenientes derivados de su participación en el estudio verbalmente y por escrito y las madres firmaron un consentimiento informado (Anexo A-1). Se informó a las madres sobre la posibilidad de abandonar el estudio en el momento que lo deseara. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética e Investigación del Departamento Dr. Peset (Anexo A-2). Al finalizar la participación en el estudio, se hizo entrega a cada madre de un ejemplar del libro "Bésame mucho", del Dr. Carlos González (González, 2003).

#### E. SEGUIMIENTO.

El seguimiento del estudio tuvo lugar a lo largo del primer mes postparto y durante el mismo hubo 4 contactos con cada madre participante.

El primero tuvo lugar durante el ingreso de las mujeres en la maternidad del Hospital Dr. Peset entre las 24 y las 48 horas. Los 3 contactos posteriores tuvieron

## IV. MATERIAL Y METODOS

lugar en el centro de salud.

En cada contacto, en el centro de salud, se llevaron a cabo las actividades previstas para el estudio y las actividades propias del programa de supervisión de la salud infantil de la Consellería de Sanitat (Consellería de Sanitat, 1999). En la primera visita se abrió historia clínica al recién nacido y a su madre, obtuvieron los datos de anamnesis e incluyendo la realización de una historia clínica de lactancia. En esta y en todas las siguientes el recién nacido fue explorado y así mismo se realizó una observación de una toma de pecho. Desde la primera visita se estableció un plan de cuidados individualizado para cada díada madre-lactante para ofrecer el apoyo necesario a cada una. A continuación se detallan las actividades realizadas en cada visita.

### i. Primera Visita:

#### Momento y Lugar:

Primer-segundo día postparto en la Maternidad del Hospital Dr. Peset .

#### Actividades:

- Captación: Informe sobre objetivos del estudio, características y exigencias de la participación.
- Firma de consentimiento informado por las madres.
- Asignación a uno de los dos grupos.
- Recogida de datos socio-demográficos y de filiación y datos de somatometría de la madre: peso y talla.
- Recogida de un recordatorio de 24 horas de la dieta materna (Anexo A-3),
- Obtención de muestras de leche materna y orina del RN y remisión inmediata al laboratorio de la Facultad de Medicina para congelación a -80°C en menos de 2 horas.
- Citación para las siguientes visitas en la consulta de lactancia materna del centro de salud de la Fuente de San Luís, en la primera semana de vida.

## IV. MATERIAL Y METODOS

- Entrega de formularios e instrucciones para recoger "3 registros dietéticos de 24 horas" (Anexo A-4).

### ii. Segunda Visita:

#### Momento y Lugar:

En la primera semana, en el Centro de Salud.

#### Actividades:

- Apertura de historia clínica de lactancia, valoración y apoyo a la lactancia personalizado para la correcta instauración de la misma.
- Recogida de nuevo recordatorio dietético de 24 horas y entrega de formulario para recogida de 6 registros dietéticos con instrucciones a la madre para que realizara la recogida de 3 de dichos registros tras esta visita y los otros tres, para registrar 4 días antes de la visita de los 15 días en el centro de salud de la Fuente de San Luis.
- Acuerdo sobre fecha de la siguiente visita.

### iii. Tercera Visita:

#### Momento y Lugar:

A los 15 días, en el centro de salud.

#### Actividades:

- Valoración y apoyo a la lactancia.
- Repaso de la información recogida con los registros dietéticos realizados y recogida de nuevo recuerdo dietético de las 24 horas anteriores a la visita,
- Entrega de nuevos formularios para la recogida de otros tres registros dietéticos.
- Recogida de muestras de leche materna y de orina del bebé y remisión inmediata al laboratorio de la Facultad de Medicina para congelación a

## IV. MATERIAL Y METODOS

- 80°C en menos de 2 horas.

### iv. Cuarta Visita:

#### Momento y Lugar:

- Al mes, en el Centro de Salud.

#### Actividades:

- Valoración y apoyo a la lactancia.
- Repaso de la información recogida con los registros dietéticos realizados y recogida de nuevo recuerdo dietético de las 24 horas anteriores a la visita.
- Recogida de muestras de leche materna y de orina del bebé y remisión inmediata al laboratorio de la Facultad de Medicina para congelación a - 80°C en menos de 2 horas.
- Entrega de cartas para pediatra de atención primaria y del libro de lactancia a las madres.
- Fin de seguimiento.

## F. VARIABLES.

### i. Variables independientes

#### a. Variables generales

##### ⓐ Madre:

Nivel sociocultural y económico, hábitos tóxicos, control del embarazo, enfermedades previas, complicaciones durante la gestación, edad, paridad, peso pregestacional, peso y talla preparto y tensión arterial (mm Hg) en el momento de la captación. Además se realizó de estudio bioquímico en sangre materna en puerperio inmediato.

## IV. MATERIAL Y METODOS

### ⌚ Recién nacido

Edad gestacional, peso, talla y perímetro cefálico al nacimiento y al mes de vida.

### b. Variables nutricionales (madre)

#### ⌚ Ingesta materna:

- Energía (Kcal/día).
- Macronutrientes (carbohidratos, lípidos y proteínas).
- Micronutrientes:
  - o Vitamina A,
  - o Vitamina B1, B2, B6 y B12,
  - o Ac. Fólico,
  - o Vitamina C,
  - o Vitamina D,
  - o Vitamina E,
  - o Ca, P, Mg, Zn y Fe.

#### ⌚ Bioquímica sanguínea basal

- Glucosa.
- Urea.
- Creatinina.
- Hierro.
- Calcio.
- Fósforo.
- Fosfatasa Alcalina.
- Proteínas totales.
- Colesterol Total, HDL, LDL y VLDL.
- Triglicéridos séricos.
- GOT, GPT, GGT.

## IV. MATERIAL Y METODOS

- Acido Úrico.

### ii. Variables dependientes

#### a. Capacidad Antioxidante total en leche materna

- Método ABTS<sup>•+</sup>.
- Método FRAP.
- Método DPPH.

#### b. Antioxidantes en leche materna

- Polifenoles totales.
- Coenzima Q<sub>10</sub>.

#### c. Daño oxidativo a macromoléculas

- Malondialdehído, indicador del daño lipídico.
- Contenido en grupos carbonilo, indicador del daño a proteínas.
- 8-dOH-guanosina, indicador del daño al ADN.

#### IV. MATERIAL Y METODOS

### 2. SUPLEMENTO

A las madres del grupo de intervención les fueron proporcionadas 60 latas de cerveza sin alcohol de 330 mL, que fueron depositadas en su domicilio, y cuya composición puede verse en la tabla II-1.

<b>Grado alcohólico real (% vol.)</b>	0,7
<b>Extracto seco (g/100g)</b>	4,5
<b>Proteína (g/100g)</b>	0,3
<b>Cenizas (g/100g)</b>	0,1
<b>Carbohidratos (g/100g)</b>	3,1
<b>Valor energético (Kcal/100 mL)</b>	21
<b>Acidez total (% como láctico)</b>	0,2
<b>Ca (mg/L)</b>	49,38
<b>Mg (mg/L)</b>	82,34
<b>K (mg/L)</b>	299,32
<b>Na (mg/L)</b>	65,67
<b>VIT B1 (mg/100mL)</b>	0,009
<b>VIT B2 (mg/100 mL)</b>	0,021
<b>Folatos (µg/100 mL)</b>	3,97
<b>Polifenoles totales (mg/mL)</b>	22,57
<b>Procianidinas (mg/mL)</b>	1749
<b>Catequinas (mg/mL)</b>	337
<b>Melanoidinas (mg/mL)</b>	5,77

## IV. MATERIAL Y METODOS

### 3. METODOLOGÍA

#### A. DATOS DIETÉTICOS

##### i. Recuerdos Dietéticos de 24 Horas

Todos los recordatorios fueron obtenidos mediante entrevista personal en la consulta. Se requirió de cada madre información detallada sobre la ingesta en cada una de las tres visitas al Centro de Salud mediante un recordatorio detallado de los alimentos ingeridos en las 24 h anteriores (recordatorio de 24 horas). Para ello, se revisó con cada madre, primero el consumo realizado en las principales comidas y después el consumo entre horas. Se procuró estimar con el mayor detalle posible las cantidades mediante modelos normalizados y con medidas utilizadas comúnmente (vaso, taza, tazón, plato, cuchara, etc.), también se inquirió sobre los ingredientes de los platos cocinados.

##### ii. Registros Dietéticos de 24 Horas

En el primer contacto se instruyó a las madres para que recogieran 3 registros dietéticos consecutivos de 24 horas, anotando todos los alimentos e ingredientes consumidos en 3 periodos de 3 días consecutivos a lo largo del primer mes. Cada tanda de registros debía ser iniciada 4 días antes de cada visita. En cada visita al Centro de Salud, las mujeres entregaron los registros y se repasó con ellas la información procurando aumentar la precisión de los datos recogidos estimando el tipo y cantidad de alimentos, la forma de cocinado y el tamaño de las raciones.

#### B. MUESTRAS

##### i. Modo de recogida

Cada mujer participante donó una muestra de entre 10-20 mL de leche que fue obtenida con el extractor eléctrico Symphony de Medela (10 - 20mL) entre las 8

#### IV. MATERIAL Y METODOS

y las 10 de la mañana. Se recogió la leche de un pecho mientras la madre amamantaba a su hijo. Las visitas se planificaron con el objetivo de obtener leche en tres momentos diferentes de lactancia: al inicio de la misma (calostro), a los 15 días (leche de transición) y a los 30 días (leche madura).

En las mismas visitas, se recogió una muestra de orina de cada lactante. Para la recogida se utilizaron bolsas recolectoras tipo Hollister.

##### **ii. Transporte, conservación y procesado de las muestras**

Inmediatamente tras la extracción, las muestras fueron remitidas por mensajería urgente al laboratorio del Departamento. A la llegada al laboratorio, la leche fue centrifugada a baja velocidad (1000 rpm durante 10 minutos) para separar los componentes celulares. Se procedió a nueva centrifugación a velocidad más rápida (5000 rpm durante 25 minutos) para la obtención de leche desnatada que fue la utilizada para los análisis. La leche así obtenida y la orina de los lactantes se almacenaron en tubos de criocongelación y se congelaron, en alícuotas, a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su procesamiento. Todas las muestras fueron congeladas en un periodo inferior a 2-3 horas después de su recolección. Las muestras de sangre materna obtenidas al inicio fueron procesadas realizar las pertinentes pruebas bioquímicas.

La filiación de los datos se mantuvo anónimo y el grupo al que pertenecían las muestras permaneció oculto para los investigadores que realizaron los análisis de las muestras.

## IV. MATERIAL Y METODOS

### C. MÉTODOS DE DE ANÁLISIS.

#### i. Análisis dietético.

La composición nutricional de las dietas maternas se obtuvo mediante el análisis realizado con la aplicación informática Alimentación y Salud (BitASDE General Médica Farmacéutica). Esta aplicación utiliza la Base de Datos de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Granada.

#### ii. Análisis de laboratorio.

El estudio analítico de las muestras se realizó en el Laboratorio Clínico del Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina por la Dra. Victoria Valls Bellés, la Dra. Ana Belén López Jaén y la licenciada María Miralles Molina.

##### a. Capacidad antioxidante total (CAT) en la leche materna.

La capacidad antioxidante total de la leche materna fue medida con los métodos ABTS<sup>•+</sup>, DPPH y FRAP.

##### ⓐ Método ABTS<sup>•+</sup>

Para la determinación de la capacidad antioxidante total se siguió el método ABTS<sup>•+</sup> de Miller y Rice Evans (Miller, 1997) modificado por Pellegrini (Re, 1999), basado en la oxidación del ABTS (2,2´azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sal diamónica del ácido sulfónico) por el persulfato potásico para formar el radical ABTS<sup>•+</sup>, el cual es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. El ABTS<sup>•+</sup> tiene un color verde azulado que absorbe luz a 734 nm y pierde el color al

#### IV. MATERIAL Y METODOS

pasar de nuevo a su forma reducida tras la acción de las sustancias antioxidantes presentes en el líquido estudiado, en este caso la leche materna. Este radical reacciona con casi todos los antioxidantes, hidrófobos o hidrófilos y no se ve afectado por fuerzas iónicas.

La generación del reactivo ABTS<sup>•+</sup>, 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 (30 µl de leche materna) en 3 mL de reactivo ABTS<sup>•+</sup>. 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.

##### ⌚ Método DPPH.

El método DPPH de Brand-Williams (Brand-Williams, 1995) que se basa en la actividad secuestrante del radical libre DPPH (2,2 difenil-1-picohidrazil). El DPPH<sup>•</sup> es uno de los pocos radicales orgánicos nitrogenados estables. La solución en etanol de este radical tiene un intenso color púrpura que vira a amarillo cuando el radical es reducido al reaccionar con un antioxidante y esto permite medir la capacidad antioxidante de la leche en este caso.

Para preparar el reactivo se disolvió el DPPH 1 mM con etanol absoluto y se mezclaron 80 µl de leche con 1,420 o 1,400 mL de reactivo (máximo de absorción a 517 nm). Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos (tiempo necesario para la estabilidad de la muestra) antes de ser centrifugada. Entonces se procedió a determinar espectrofotométricamente a 517 nm el contenido, en la alícuota. Los resultados fueron expresados en mM de Trolox utilizando una curva de calibrado con diferentes concentraciones de Trolox.

##### ⌚ Método FRAP

Este método basado en el método de Benzie y Strain (Benzie, 1996) fue utilizado para medir el poder reductor de las muestras de leche.

## IV. MATERIAL Y METODOS

Se preparó la mezcla con acetato sódico 300 mM, pH: 3,6, TPTZ (2, 4, 6- Tris (2-pyridyl)-S-triazine) 40 mM, FeCl<sub>3</sub> 20 mM en una proporción 10/1/1; v/v/v. Con 3 mL de este preparado de reactivo y 30 µl de leche materna se obtuvo una mezcla que fue incubada a 37°C durante 30 minutos en oscuridad. Tras la misma, se centrifugó y se procedió a lectura espectrofotométrica a 593 nm. Los resultados fueron expresados como µmoles de Fe<sup>2+</sup> usando una recta de calibrado con diferentes concentraciones de FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O.

### b. Contenido en antioxidantes

#### ⊕ Determinación de polifenoles totales en la leche (método de Folin-Ciocalteu).

Para medir el contenido total en polifenoles en las muestras de leche materna, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (Singleton, 1991), que se basa en la oxidación de los polifenoles con el reactivo de Folin (mezcla de fosfomolibdenato y fosfotungstenato). Al mezclar la muestra de leche con el reactivo, se consigue la formación de un complejo azul cuya absorbancia se mide con espectrofotómetro a 750 nm.

Para cada determinación se mezclaron 100 µL de leche con 2 mL de acetona, agua y ácido acético en proporciones 70/28/2, v/v/v. Esta mezcla fue sonicada 3 veces y posteriormente centrifugada para separar el sobrenadante. Esta operación fue repetida 4 veces tras lo que se recogieron 100 µl del sobrenadante que fueron añadidos a 500µl de solución de reactivo de Folin y 400 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (dilución 1/10). Tras incubación a temperatura ambiente durante 40 minutos, la absorbancia de la muestra se midió espectrofotométricamente a 750 nm, utilizando como estándar el ácido gálico.

#### ⊕ Determinación del coenzima Q10

El contenido en coenzima Q10 de la leche humana se determinó utilizando la técnica de Tang (Tang, 2006) de detección electroquímica mediante

#### IV. MATERIAL Y METODOS

cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). 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. Esta 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 y el proceso se repitió 3 veces. Finalmente se recogió la fase hexano así obtenida se evaporó con N<sub>2</sub>. Posteriormente se resuspendió la muestra con 200 µL de etanol y se inyectaron al HPLC 50 µL de la misma. Para la recta de calibrado se utilizó Coenzima Q<sub>10</sub> 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 NaClO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O en 1000 mL de Etanol-Metanol- (70%-HClO<sub>4</sub>) en proporción 900:100:1, v/v/v, velocidad de flujo: 1 mL/minuto. Lectura a una absorbancia de 275 nm.

##### c. Daño oxidativo del lactante, mediciones en orina

###### ⊕ Malondialdehído (MDA)

Para medir el grado de oxidación lipídica en orina realizamos determinación de Malondialdehído. Este marcador fue determinado mediante espectrofotometría a 532 nm. Tras reacción del ácido Tiobarbitúrico y separación con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según el método de Mateos (Mateos, 2005).

Se mezcló un volumen de 250 µL de orina con 50 µL de NaOH 6 M y se incubó a 60 ° C durante 30 minutos para proceder a la hidrólisis alcalina de los enlaces del MDA con las proteínas presentes en las muestras. Posteriormente, se añadieron 125 µL de ácido perclórico 35% (v/v) y el preparado fue centrifugado a 2800 g durante 10 minutos para una mejor precipitación de las proteínas. Tras transferir 250 µL de sobrenadante a un tubo Eppendorf se añadieron 25 µL del reactivo derivatizante, DNPH 5 mM con ácido clorhídrico 2 M. Tras incubación durante 30 minutos a T. ambiente en ausencia de luz, se inyectaron 50 µL al HPLC para la realización de las determinaciones.

## IV. MATERIAL Y METODOS

### ⓐ Contenido en Grupos Carbonilo (CGC)

Para la medición del daño oxidativo a las proteínas se cuantificaron los grupos carbonilos formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidracina (DNFH) en condiciones ácidas, según el método espectrofotométrico de Levine (Levine, 1990) con modificaciones de Tian (Tian, 1998). Las proteínas fueron separadas mediante precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina. En las proteínas así derivatizadas se midió colorimétricamente la DNFH unida a proteínas ( $\epsilon_{373}=21 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

Se utilizaron entre 0,5–1 mg/mL de proteína, a los que se añadió tampón de conservación de mitocondrias hasta 1 mL de volumen final. Este preparado fue centrifugado a 13.600 rpm durante 10 minutos y al sobrenadante se le añadió estreptomicina sulfato 10% con tampón Hepes 50 mM pH: 7,2, en una proporción de 1/9 v/v. Tras centrifugar se recogieron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante a los que se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de 2,4 dinitrofenilhidracina (DNFH) 10 mM /CIH 2,5 M a las muestras y 400  $\mu\text{L}$  de CIH 2,5 M a los controles. Tras incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación ocasional, se volvió a centrifugar a 12.600 rpm durante 3 minutos y se añadió 1 mL de TCA al 20%. Tras centrifugar de nuevo a 12.600 rpm durante 3 minutos, se recogió el pellet y se lavó 3 veces con 1 mL de etanol y acetato de etilo (1:1, v/v). Se volvió a centrifugar de nuevo a 12.600 rpm durante 3 minutos y se volvió a recoger el pellet. Finalmente se añadió 1 mL de guanidina 6 N a pH: 2,3, se centrifugó a 12600 rpm y se midió el sobrenadante a una  $A= 366 \text{ nm}$  frente a una solución de guanidina.

### ⓐ 8-OH-deoxiguanosina.

La concentración de 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) (el compuesto oxidado del nucleósido Guanosina del ADN) fue utilizado para determinar el daño oxidativo al ADN. Para su determinación se utilizó el kit de la 8-OHdG-EIA-BIOTECH (OXIS Health Products, Inc. 6040 N Cutter Circle, Suite 317 Portland, OR 97217- 3935 U.S.A.). Esta técnica utiliza una placa que contiene 8-OHdG fijada y se basa en la

#### IV. MATERIAL Y METODOS

competencia de 8-OHdG de la muestra con la 8-OHdG de la placa por un anticuerpo monoclonal.

A la placa se añadió la muestra de **orina** y el anticuerpo monoclonal de 8-OHdG. Los anticuerpos unidos a la 8-OHdG de la muestra son arrastrados posteriormente con el lavado permaneciendo tan sólo aquéllos que se habían unido a la 8-OHdG de la placa. Al añadir con posterioridad un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente éste se une al anticuerpo monoclonal que había permanecido en la placa mientras que el excedente no unido fue arrastrado mediante un proceso de lavado. Finalmente se le añadió el cromógeno del kit y se midió la intensidad de coloración (proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a la placa) (Tokoyuni, 1997).

##### iii. Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa SPSS, v 17;( SPSS Inc., Chicago, IL.) Para Windows. Realizamos en primer lugar un análisis descriptivo de cada variable estudiada y estudiamos la normalidad de sus distribuciones con el test de Kolmogorov. Las variables para las que se observó una distribución "no normal" fueron sometidas a transformación logarítmica.

El análisis se realizó por intención de tratar. La significación estadística se estableció en 0,05 (error alfa 5%).

Para el análisis comparativo utilizamos un Test T de Student. Para valorar las diferencias intragrupo (evolución de resultados desde el inicio al final dentro de cada grupo) utilizamos un test T de Student de 2 colas para muestras apareadas. Las diferencias intergrupo fueron valoradas con un test T de Student de 2 colas para muestras independientes. En ambos casos utilizamos un test de Levene para el estudio de las varianzas.



## V. RESULTADOS



## V. RESULTADOS

## V. RESULTADOS

## 1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PARTICIPANTES

En la tabla V.1 se describen las características generales de las díadas participantes en cada grupo: edad, peso materno medio al inicio y al final de la gestación, talla y peso al nacimiento de los lactantes participantes. No hubo diferencias significativas entre grupos en los parámetros analizados.

<b>Tabla V-1. Características de las participantes</b>			
	<b>Control</b>	<b>Intervención</b>	<b>p</b>
<b>Edad (años)</b>	31,26 ± 3,3	29,63 ± 4,7	0,335
<b>Peso pregestacional (kg)</b>	61,96 ± 6,89	61,39 ± 6,8	0,930
<b>Peso preparto (kg)</b>	73,3 ± 7,00	75,07 ± 7,59	0,709
<b>Talla materna (cm)</b>	162,2 ± 3,94	162,87 ± 5,86	0,589
<b>IMC madre</b>	23,46 ± 4,16	23,46 ± 2,25	0,900
<b>Peso(lactante) al nacimiento (g)</b>	3.350 ± 266	3.170 ± 390	0,239
<b>Peso (lactante) al mes (g)</b>	4.121 ± 887	4.025 ± 530	0,596
Los resultados se expresan en Media ± Desviación estándar			

En el estudio bioquímico basal de las mujeres participantes de ambos grupos, no se detectaron alteraciones de interés ni diferencias significativas intergrupos (Tabla V-2).

## V.RESULTADOS

**Tabla V-2. Determinaciones bioquímicas obtenidas en suero materno.**

	<b>Control</b>	<b>Intervención</b>	<b>p</b>
<b>Glucosa (mmol/L)</b>	4,1 ± 0,5	4,2 ± 0,5	0,535
<b>Urea (mg/mL)</b>	22,4 ± 5,8	21,2 ± 4,5	0,995
<b>Calcio (mg/mL)</b>	8,8 ± 0,4	8,7 ± 0,4	0,909
<b>Fósforo (mg/mL)</b>	4,1 ± 0,7	4 ± 0,5	0,872
<b>Fosfatasa Alcalina (UI/L)</b>	126,5 ± 28,6	133,0 ± 26,5	0,875
<b>Hierro (mg/mL)</b>	53,3 ± 19,7	47,4 ± 15,9	0,267
<b>Colesterol total (mg/dL)</b>	236 ± 43	216 ± 39	0,299
<b>Colesterol HDL (mg/dL)</b>	62 ± 12	58 ± 12	0,338
<b>Colesterol LDL (mg/dL)</b>	139,2 ± 39,3	131,9 ± 36,5	0,542
<b>Colesterol VLDL (mg/dL)</b>	35,7 ± 12,6	31,9 ± 8,8	0,172
<b>Triglicéridos séricos (mg/dL)</b>	176 ± 61	158 ± 44	0,222
<b>Hierro (mmol/L)</b>	9,7 ± 3,9	8,8 ± 3,7	0,267
<b>GOT (UI/L)</b>	21,4 ± 5,6	17,9 ± 8,3	0,112
<b>GPT (UI/L)</b>	17,6 ± 7,8	13 ± 5,9	0,485
<b>GGT (UI/L)</b>	13,1 ± 6,0	13,8 ± 3,8	0,247
<b>Creatinina (mmol/L)</b>	48 ± 6,0	49 ± 7	0,958
<b>Ácido úrico (mmol/L)</b>	256 ± 59	250 ± 42	0,868
<b>Proteínas totales (g/L)</b>	59 ± 3	58 ± 4	0,083

Los resultados se expresan en Media ± Desviación estándar

## V.RESULTADOS

### 2. INGESTA MATERNA HABITUAL ESTIMADA

Con los 9 recuerdos y 3 registros de 24 horas de cada madre se calculó la ingesta habitual. Para cada mujer se obtuvo una estimación de su ingesta habitual, acumulando los datos obtenidos de todos sus registros, se realizó un análisis acumulado de ingesta dividiéndolo por el n° de días registrado. Con estos datos calculamos la ingesta habitual de energía y macro y micronutrientes para el conjunto de las madres (Tablas V-3 y V-4).

<b>Tabla V-3. Ingesta media, madres lactantes: macronutrientes y minerales.</b>				
<b>Media diaria</b>	<b>Todas las madres</b>	<b>Grupo intervención</b>	<b>Grupo control</b>	<b>p</b>
<b>Kcal</b>	2094 ± 358	2067 ± 244	2028 ± 330	0,65
<b>HC</b>	249 ± 56	244 ± 42	234 ± 49	0,47
<b>Proteínas</b>	99,2 ± 19,7	97,5 ± 14,3	95,6 ± 19,4	0,72
<b>Grasa</b>	83,9 ± 20,0	82,0 ± 14,0	84,6 ± 22,3	0,66
<b>AGM (g)</b>	32,4 ± 9,3	30,9 ± 8,9	33,5 ± 9,5	0,25
<b>AGP (g)</b>	10,2 ± 4,6	10,8 ± 5,1	9,4 ± 3,7	0,19
<b>AGS (g)</b>	30,35 ± 9,7	33,2 ± 11,4	28,3 ± 7,8	0,04
<b>Fibra (g)</b>	19,0 ± 5,6	17,5 ± 3,6	18,8 ± 5	0,32
<b>Colesterol (mg)</b>	322 ± 95	310 ± 81	313 ± 86	0,89
<b>Ca (mg)</b>	1022 ± 349	901 ± 251	970 ± 288	0,39
<b>P (mg)</b>	1396 ± 376	1243 ± 279	1307 ± 287	0,44
<b>K (mg)</b>	3260 ± 872	3122 ± 425	2966 ± 695	0,39
<b>Na (mg)</b>	2334 ± 728	2292 ± 869	2300 ± 425	0,97
<b>Fe (mg)</b>	16,3 ± 4,5	14,7 ± 2,6	16,8 ± 4,0	0,06
<b>Zn (mg)</b>	11,5 ± 7,6	9,0 ± 1,6	9,3 ± 2,6	0,7
<b>I (mcg)</b>	83,7 ± 35,9	77,6 ± 26,7	76,4 ± 33,9	0,89
<b>Cu (mg)</b>	9,87 ± 1,5	9,76 ± 1,4	9,3 ± 1,5	0,29
<b>Mn (mg)</b>	8,7 ± 8,2	7,3 ± 7,0	9,3 ± 8,0	0,41
<b>Mg (mg)</b>	335 ± 64	350 ± 55	329 ± 67	0,25
<b>Se (mg)</b>	73,8 ± 20	75,4 ± 20,3	70,6 ± 19,2	0,06

Los resultados se expresan en Media ± Desviación estándar  
 HC: hidratos de carbono. AGM: ácidos grasos monoinsaturados, AGS: ácidos grasos saturados, AGP: ácidos grasos poliinsaturados

## V.RESULTADOS

Al comparar la ingesta media de nutrientes inter-grupos (Tabla V-3 y Tabla V-4) no se observaron diferencias significativas en el consumo intergrupos para la ingesta de micro o macronutrientes.

**Tabla V-4. Ingesta media, madres lactantes (total y por grupos): vitaminas.**

Media diaria	Todas las madres	Grupo Intervención	Grupo control	p
<b>Vit. A (µg)</b>	782 ± 350	685 ± 233	769 ± 352	0,37
<b>Vit. D (µg)</b>	3,7 ± 2,7	4,3 ± 2,3	3,8 ± 3,1	0,55
<b>Vit. E (mg)</b>	9,8 ± 5,5	9,9 ± 7,1	10,5 ± 5,2	0,77
<b>Vit. B1 (µg)</b>	2,6 ± 2,4	3,3 ± 4,2	2,5 ± 1,5	0,33
<b>Vit. B2 (µg)</b>	2,0 ± 0,7	1,6 ± 0,3	2,0 ± 0,7	0,10
<b>Vit. B6 (mg)</b>	2,2 ± 0,9	1,9 ± 0,5	2,2 ± 1,1	0,30
<b>Niacina (mg)</b>	28,9 ± 6,5	29,6 ± 6,00	28,6 ± 6,7	0,57
<b>Ac. Pantoténico (mg)</b>	4,2 ± 1,2	4,0 ± 0,8	4,4 ± 1,3	0,30
<b>Ac. Fólico (µg)</b>	265 ± 84,6	257,6 ± 58,90	257,8 ± 91,4	0,99
<b>Vit. B12 (µg)</b>	8,9 ± 4,9	8,0 ± 3,2	10,4 ± 5,5	0,1
<b>Vit. C(mg)</b>	114,9 ± 60,9	85,5 ± 38,0	131,3 ± 69,5	0,014

Los resultados se expresan en Media ± Desviación estándar  
 HC: hidratos de carbono. AGM: ácidos grasos monoinsaturados, AGS: ácidos grasos saturados, AGP: ácidos grasos poliinsaturados

Para evaluar la idoneidad de las dietas, se calculó la ingesta de macronutrientes en forma de % de Kcal (Tabla V-5). Además con respecto a la ingesta de grasa se calculó la ingesta de colesterol y la ingesta de ácidos grasos en forma de porcentaje de la ingesta total de grasas y de ingesta total de Kcal (Tabla V-6).

Para determinar adecuadamente la prevalencia de mujeres en riesgo de ingestas inadecuadas por defecto, comparamos las ingestas medias calculadas para cada mujer con las "estimaciones medias de requerimientos" (EMR) (EAR O "Estimated average requirements" en inglés) publicadas por la National Academy of Sciences de EEUU (Otten, 2006). Realizamos este cálculo mediante el método del "punto de corte" descrito y recomendado por la National Academy of Sciences

## V.RESULTADOS

para la evaluación de la idoneidad de ingesta nutrientes para los que existen publicados valores de EMR (Otten, 2006) (Tabla V-7).

<b>Tabla V-5. Ingesta media de macronutrientes en función de la ingesta calórica</b>				
	<b>Media</b>	<b>% mujeres ingesta inferior <sup>a</sup></b>	<b>Rango Recomendado <sup>b</sup></b>	<b>% mujeres ingesta superior <sup>c</sup></b>
<b>%/Kcal Tot.</b>	<b>(<math>\bar{x} \pm DS</math>)</b>	<b>%</b>	<b>%</b>	<b>%</b>
<b>Proteínas</b>	19,1 ± 2,8	0	10-35	0
<b>HC</b>	44,5 ± 6,2	<b>42,0</b>	45-65	1,5
<b>Grasas</b>	36,5 ± 6,3	1,5	20-35	<b>53,6</b>

$\bar{x} \pm DS$ : media  $\pm$  desviación estándar.  
<sup>a</sup>% mujeres con ingesta menor del rango inferior recomendado,  
<sup>b</sup>Rango recomendado de ingesta (RDA, 2006),  
<sup>c</sup>% mujeres con ingesta superior al recomendado.

La ingesta de macronutrientes se analizó comparando 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 una ingesta media de Kcal procedente de proteínas por encima del 15% (un 87,32% de las mujeres ingería proteínas por encima del 15%) pero no se observó ningún caso de ingesta deficitaria de proteínas al analizar la ingesta protéica según el peso individual (gramos de proteína consumido por kg de peso) ni de ingesta inferior al 10% o superior al 35% de la ingesta calórica total. Respecto al consumo de HC, sólo un 3% de las mujeres ingirieron un porcentaje igual o superior al 55% del total Kcal en forma de HC y un 42% de las mujeres realizaban una dieta habitual pobre en carbohidratos (por debajo del nivel inferior recomendado de 45% de Kcal totales) (Tabla V-5).

El 80,69% de las madres que participaron en el estudio tuvieron una ingesta grasa media diaria que superaba el 30% de las Kcal totales consumidas y un 53,62% superaba el rango superior recomendado del 35%. Respecto a la proporción de ácidos grasos (AG) el 100% de las mujeres tuvo un consumo relativo de ácidos grasos (referido al consumo total de ácidos grasos) poliinsaturados (AGP) inferior al 30%, el de ácidos grasos monoinsaturados (AGM) fue mayor del 35% en el 100% de

## V.RESULTADOS

la población y el de ácidos grasos saturados (AGS) fue mayor del 30% en el 99% de las mujeres. Expresado en forma de % Kcal la media de consumo de AGS se situó en 12,9% y un 84% de las mujeres tuvo una ingesta de AGS superior al 10% y un 23% consumía más del 15%.

<b>Tabla V-6. Ingesta de ácidos grasas</b>			
	$\bar{x} \pm DS$ (/100 g ácidos grasos)	$\bar{x} \pm DS$ (/100 Kcal)	
<b>AGP</b> <sup>a</sup>	11,90 ± 3,89	4,33 ± 1,58	
<b>AGM</b> <sup>b</sup>	38,20 ± 6,19	13,97 ± 3,85	
<b>AGS</b> <sup>c</sup>	35,70 ± 6,71	12,82 ± 2,78	
<b>Aporte de ácidos grasos en función de las Kcal totales</b>			
	$\bar{x} \pm DS$	<b>% con ingesta AGS &gt;10%</b>	<b>% con ingesta AGS &gt;15%</b>
<b>% Kcal aportado por AGS</b> <sup>d</sup>	12,82 ± 2,78	84,06	23,19
$\bar{x} \pm DS$ , media ± desviación estándar. <sup>a</sup> AGP: Ácidos grasos poliinsaturados. <sup>b</sup> AGM: Ácidos grasos monoinsaturados. <sup>c</sup> AGS: ácidos grasos saturados. <sup>d</sup> % Kcal aportado por AGS: (aporte de ácidos grasos expresado en % Kcal totales.			

Para analizar el consumo de nutrientes y para la evaluación de la prevalencia estimada de ingestas inadecuadas se realizó una comparación de las ingestas estimadas como habituales con las estimaciones medias de requerimientos (EMR) y se utilizó el método del punto de corte descrito por Otten (Otten, 2006). En este se compara la ingesta habitual de cada nutriente y de cada participante con la EMR y se halla el porcentaje de personas cuya ingesta está por debajo de la ingesta recomendada.

## V.RESULTADOS

**Tabla V-7. Ingesta de nutrientes en relación a las EMR a y cálculo de la prevalencia de ingestas inadecuadas por defecto.**

	% ingesta deficiente <sup>b</sup>	EMR 2006
<b>Colesterol (mg/día)</b>	4,35	160
<b>Proteínas (g/kg/día)</b>	16	1,05
<b>P (mg/día)</b>	1,4	580
<b>Fe (mg/día)</b>	0	6,5
<b>Zn (mg/día)</b>	<b>65</b>	10,4
<b>I (µg/día)</b>	100	209
<b>Mg (mg/día)</b>	<b>10</b>	265
<b>Cu (mg/día)</b>	<b>46,4</b>	1
<b>Se (µg/día)</b>	<b>27,5</b>	59
<b>Vit. A (µg/día)</b>	<b>73,9</b>	900
<b>Vit. E (mg/día)</b>	<b>89,9</b>	16
<b>Vit. B<sub>1</sub> (mg/día)</b>	17	1,2
<b>Vit. B<sub>2</sub> (mg/día)</b>	7,3	1,3
<b>Niacina (mg/día)</b>	0	13
<b>Vit. B<sub>6</sub> (mg/día)</b>	<b>24,6</b>	1,7
<b>Ac. Fólico (µg/día)</b>	<b>95,7</b>	450
<b>Vit. B<sub>12</sub> (µg/día)</b>	2,9	2,4
<b>Vit. C (mg/día)</b>	<b>44,9</b>	100

<sup>a</sup> EMR: Estimaciones medias de requerimientos.

<sup>b</sup> % ingesta deficiente: % de mujeres cuya ingesta habitual es inferior a la estimación media de requerimientos.

mcg: microgramos; mg: miligramos.

Para aquellos nutrientes para los que se ha definido, un límite superior tolerable de ingesta (Máxima ingesta tolerable (MIT)) por encima del cual se considera que aumenta el riesgo de enfermedad) calculamos el porcentaje de mujeres en riesgo por exceso (Tabla V-8).

## V.RESULTADOS

Tabla V-8. % Ingesta de nutrientes en relación a las recomendaciones y cálculo de la prevalencia de ingestas inadecuadas por exceso.

	MIT <sup>a</sup>	% ingesta > MIT <sup>b</sup>
Ca (mg/día)	2500	0
P (mg/día)	4000	0
Na (mg/día)	<b>2300</b>	49,28
Cl (mg/día)	3600	1,5
Fe (mg/día)	45	0
Zn (mg/día)	40	1,5
I (mcg/día)	1100	0
Mg (mg/día)	<b>350</b>	43,5
Mn (mg/día)	<b>11</b>	39,1
Se (mg/día)	400	0
Cu (mg/día)	<b>10</b>	39,1
Vit. A (mcg/día)	3000	0
Vit. D (mcg/día)	50	0
Vit. C(mg/día)	2000	0

<sup>a</sup> **MIT**: Máxima ingesta tolerable: traducción libre de los Upper limits (UL) definidos por la National Academy of Sciences de los EEUU como la ingesta diaria más elevada de nutrientes que probablemente no acarree riesgo o enfermedad para la mayoría de los individuos en la población general. Aunque se han definido niveles excesivos para la vitamina E, el ácido fólico y la niacina, estos sólo aplican a las ingestas en forma de suplemento por lo que no se han contemplado aquí. Para otras vitaminas no hay niveles definidos (Ottens, 2006).

<sup>b</sup> **% ingesta > MIT**: % de mujeres del estudio cuya ingesta de un determinado nutriente superó el límite establecido como sano según National Academy EEUU (Ottens, 2006).

## V.RESULTADOS

### 3. ESTADO OXIDATIVO.

#### A. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL (CAT) DE LA LECHE.

##### i. ABTS<sup>•+</sup>.

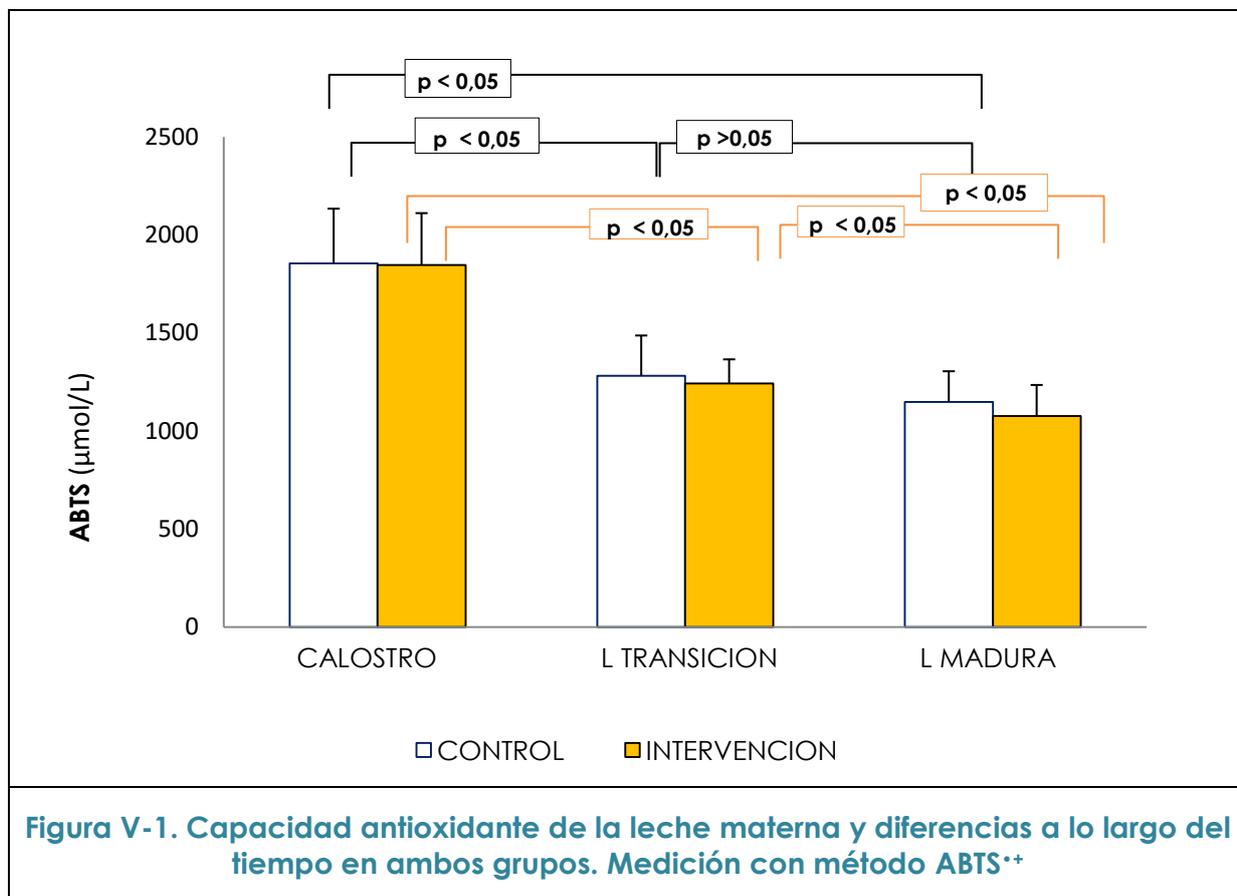
La CAT del calostro medida con este método fue más elevada que la de la leche de transición y a su vez la leche de transición mostró una CAT más elevada que la leche madura en ambos grupos. No hubo diferencias significativas en la CAT en la comparación intergrupos al inicio pero tampoco durante ni al final del estudio.

La CAT disminuyó a lo largo del primer mes en la leche tanto de las mujeres del grupo control como en la de las del grupo de intervención. Aunque en el grupo suplementado, la capacidad antioxidante total mostró variación significativa al comparar leche de transición con leche madura (los resultados se describen en la tabla V-9 y en la figura V-1).

<b>Tabla V-9. Capacidad antioxidante en leche medida con ABTS<sup>•+</sup>.</b>			
	<b>ABTS<sup>•+</sup> (µmol/L)</b>		
	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Intervención</b>	<b>p intergrupos</b>
<b>Calostro</b>	1855 ± 278	1847 ± 264	0,93
<b>L. transición</b>	1282 ± 204	1242 ± 123	0,37
<b>L. madura</b>	1148 ± 156	1076 ± 158	0,21
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Calostro vs. L Transición</b>	0,0003	0,000038	
<b>L. Transición vs. L Madura</b>	0,142	0,024	
<b>Calostro vs. L Madura</b>	0,000001	0,00012	

Los valores se expresan en media ± desviación estándar

## V.RESULTADOS



### ii. DPPH

La capacidad antioxidante total medida con este método, al inicio, obtuvo resultados similares en ambos grupos. No se observaron diferencias significativas al comparar los niveles de CAT inter-grupos al inicio pero si al final (Figura V-2).

- la CAT de la leche de las madres del grupo control disminuyó progresivamente a lo largo del primer mes. La CAT del calostro fue mayor que la de la leche de transición y en esta la CAT medida fue mayor que en leche madura (Tabla V-10 y Figura V-2).

## V.RESULTADOS

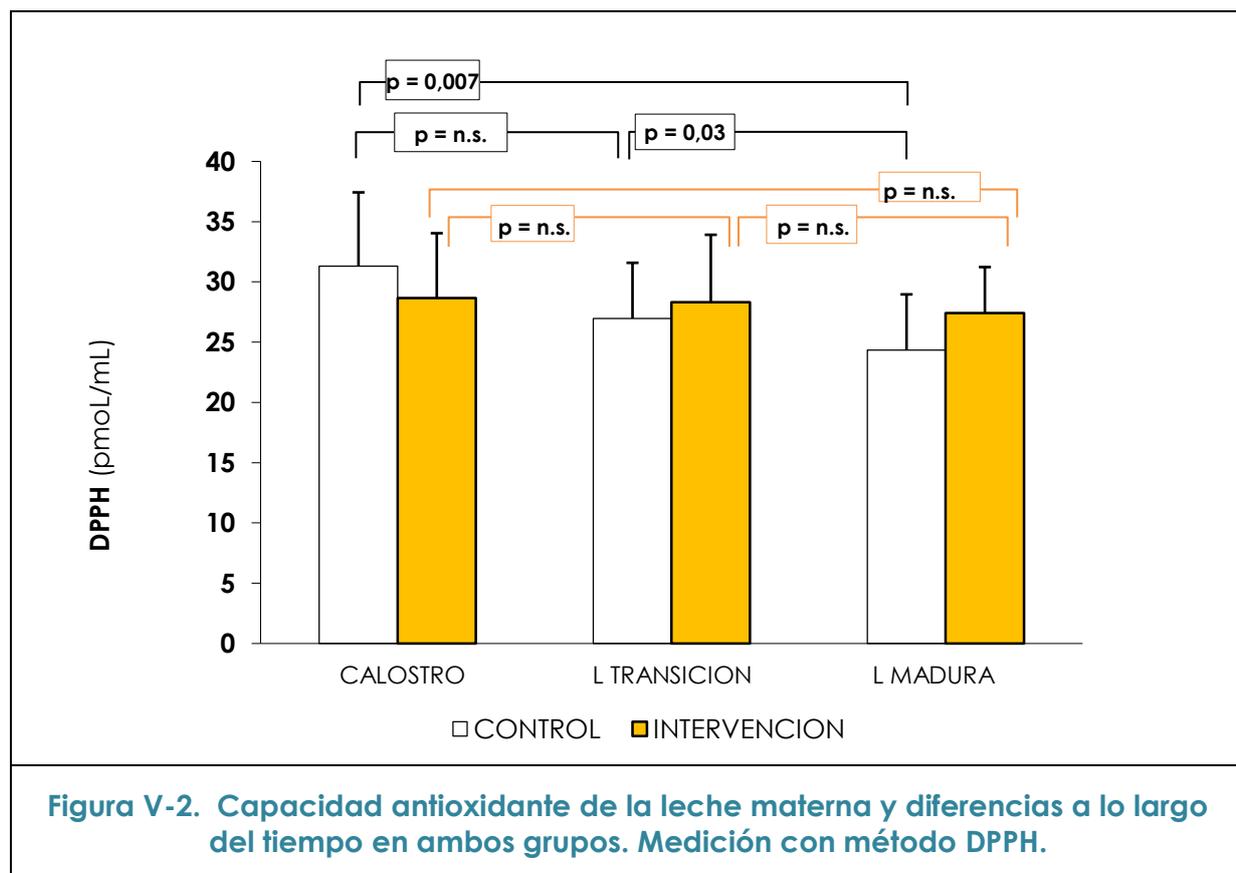
- En el grupo de intervención, la CAT se mantuvo en niveles similares a lo largo de todo el primer mes y no hubo diferencias significativas al comparar la CAT de calostro con leche de transición o leche madura (Tabla V-10 y Figura V-2).
- Sí se objetivaron niveles significativamente más elevados de CAT en la leche madura de las mujeres del grupo de intervención (Tabla V-2).

**En resumen**, con el método DPPH, no se observaron diferencias significativas en la CAT del calostro de ambos grupos, pero esta fue disminuyendo a lo largo del primer mes, sólo en la leche de las mujeres del grupo control. La leche de transición y la leche madura de las mujeres del grupo de intervención mantuvieron una CAT similar a la del calostro. Al final del primer mes, las mujeres del grupo de intervención tenían una CAT en su leche significativamente superior a las mujeres del grupo control (Tabla V-10 y Figura V-2)

<b>Tabla V-10. Capacidad antioxidante en leche medida con DPPH</b>			
	DPPH ( $\mu\text{mol}/100\text{ mL}$ )		
	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Intervención</b>	<b>p intergrupos</b>
<b>Calostro</b>	31,32 $\pm$ 6,11	28,66 $\pm$ 5,37	0,25
<b>L. transición</b>	26,96 $\pm$ 4,62	28,33 $\pm$ 5,58	0,45
<b>L. madura</b>	24,33 $\pm$ 4,63	27,41 $\pm$ 3,81	0,05
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Calostro vs. L. Transición</b>	0,03	0,81	
<b>L. Transición vs. L. Madura</b>	0,1	0,84	
<b>Calostro vs. L. Madura</b>	0,007	0,17	

Los valores se expresan en media  $\pm$  desviación estándar. L.: Leche

## V.RESULTADOS



### iii. FRAP

Al medir la CAT con el método FRAP observamos que:

- La CAT medida por este método en la leche, mostró diferencias significativas en la comparación intergrupos desde el inicio (Tabla V-11)
- en el grupo control la CAT de la leche materna fue disminuyendo a lo largo del primer mes. Se objetivaron valores significativamente inferiores en la leche de transición respecto al calostro, y en la leche madura respecto a la leche de transición en este grupo (Figura V-4).
- En el grupo de intervención se observó una disminución significativa de la CAT de la leche de transición respecto al calostro, pero los niveles parecieron estabilizarse a partir de entonces y no se observaron diferencias en la CAT al

## V.RESULTADOS

comparar la leche de transición y la leche madura, en este grupo (Tabla V-11 y Figura V-3).

**En resumen:** Al medir la CAT con el método FRAP, la CAT de la leche mostró una disminución progresiva y significativa a lo largo del primer mes en el grupo control pero no en el grupo de intervención. En este, la disminución dejó de producirse a partir de los 15 días, por lo que en este grupo no hubo diferencias significativas observadas entre la CAT de la leche de transición y la leche madura (Tabla V-11 y Figura V-3).

<b>Tabla V-11. Capacidad antioxidante en leche medida con FRAP.</b>			
	<b>FRAP (mmol/L)</b>		
	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Intervención</b>	<b>p intergrupo</b>
<b>Calostro</b>	3,21 ± 0,52	3,65 ± 0,49	0,022
<b>L. transición</b>	2,76 ± 0,67	3,21 ± 0,59	0,052
<b>L. madura</b>	2,49 ± 0,99	3,18 ± 0,83	0,041
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Calostro vs. L. Transición</b>	0,009	0,0003	
<b>L. Transición vs. L. Madura</b>	0,031	0,143	
<b>Calostro vs. L. Madura</b>	0,027	0,00001	

Los valores se expresan en medias ± desviación estándar

## V.RESULTADOS

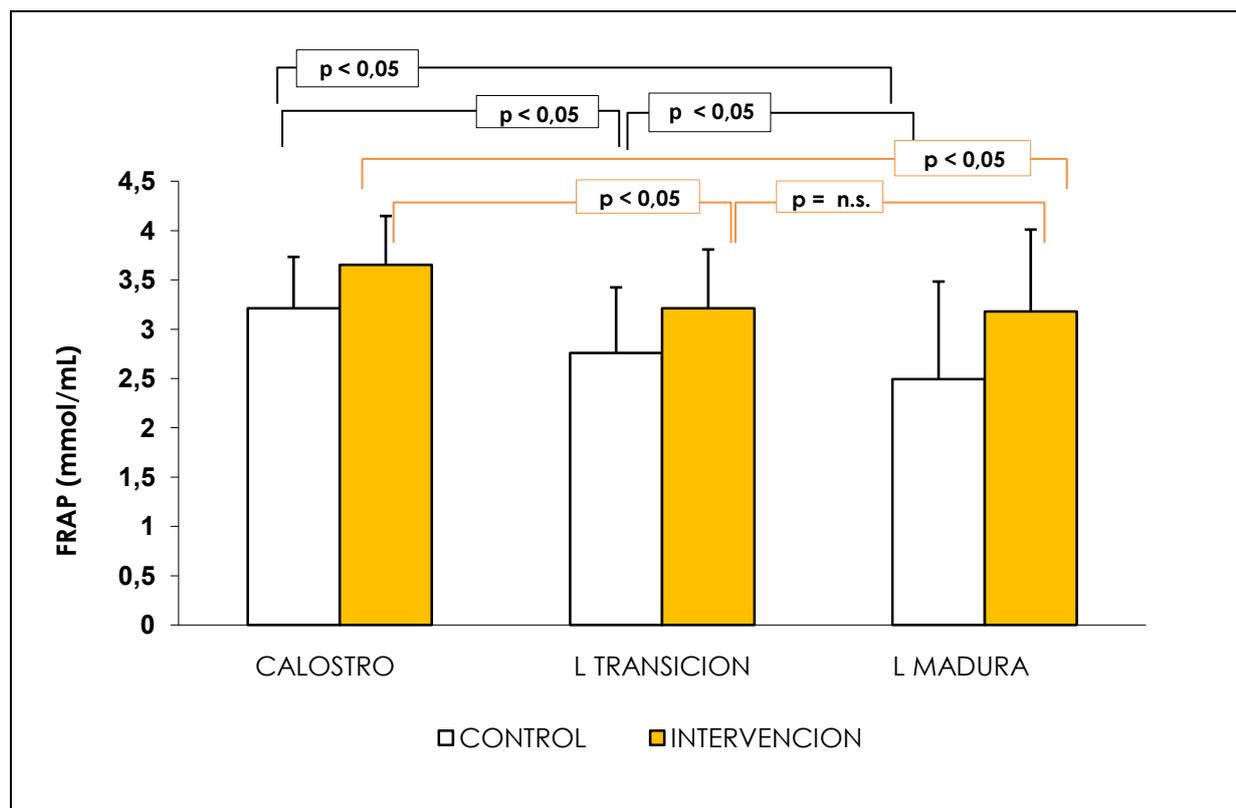


Figura V-3. Capacidad antioxidante medida con FRAP de la leche materna.

## B. CONTENIDO DE ANTIOXIDANTES EN LA LECHE MATERNA.

### i. Variaciones en el contenido en polifenoles totales.

Al medir el contenido en polifenoles totales en la leche observamos que las concentraciones de estos compuestos disminuyeron progresivamente a lo largo del primer mes en la leche de ambos grupos de mujeres (Figura V-5 y Tabla V-12):

- Los niveles de polifenoles en la leche de las mujeres fueron muy similares en ambos grupos y no se observaron diferencias significativas en el contenido a lo largo del estudio, en la comparación intergrupo.
- Los niveles fueron significativamente inferiores en la leche de transición vs calostro; significativamente inferiores en leche madura vs leche de transición y significativamente inferiores en leche madura vs calostro.

## V.RESULTADOS

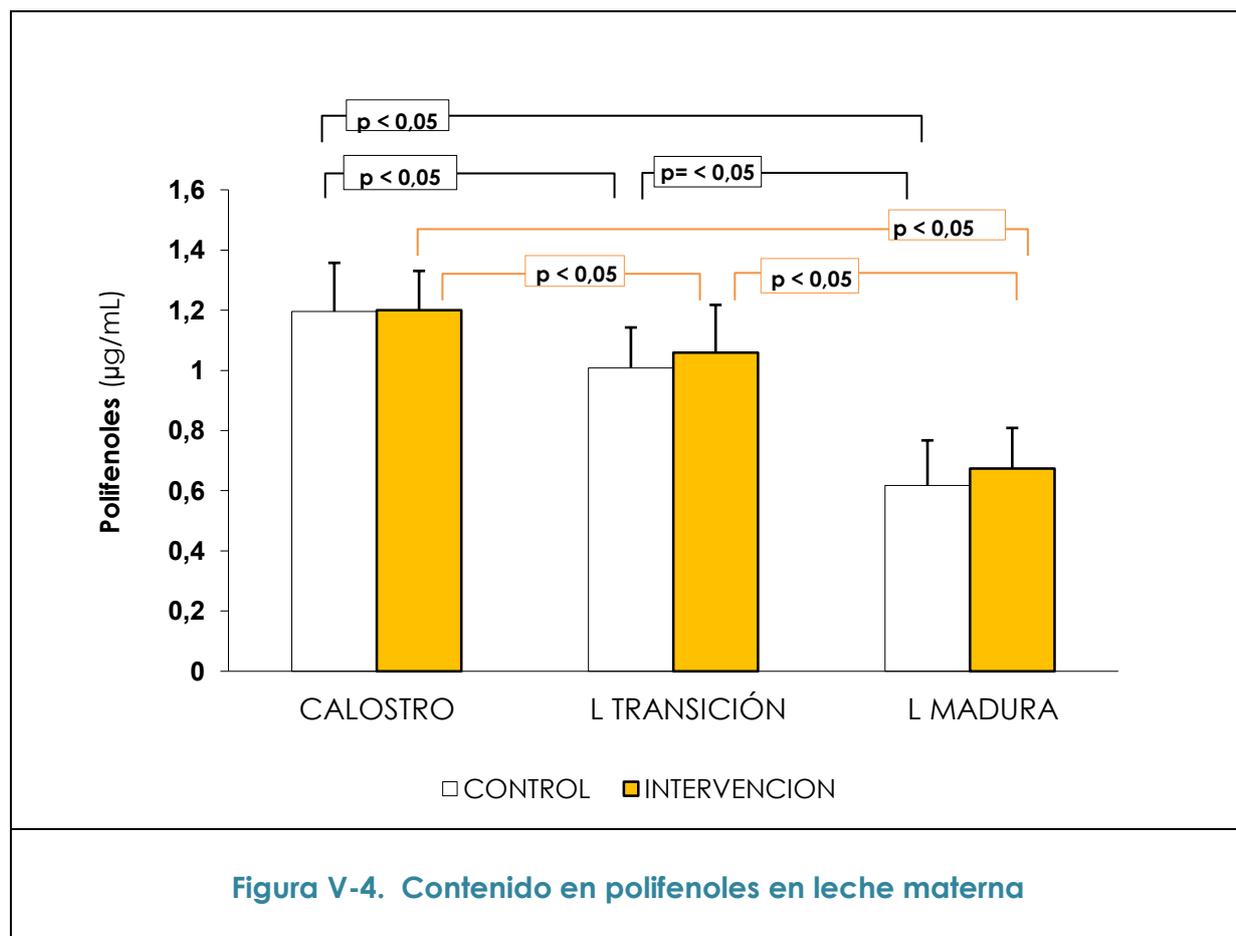
- Estas diferencias se observaron en ambos grupos

**En resumen:** se observó una disminución progresiva del contenido en polifenoles a lo largo del primer mes en las madres de ambos grupos (Figura V-5 y Tabla V-12).

Tabla V-12. Contenido en polifenoles de la leche materna (mcg GAE/mL)			
	Polifenoles(μg/mL)		
	Grupo Control	Grupo Intervención	<b>p</b> intergrupo
<b>Calostro</b>	1,19 ± 0,17	1,2 ± 0,13	0,925
<b>L. transición</b>	1,01 ± 0,14	1,06 ± 0,16	0,306
<b>L. madura</b>	0,62 ± 0,15	0,67 ± 0,13	0,228
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Calostro vs. L. Transición</b>	0,0006	0,006	
<b>L. Transición vs. L. Madura</b>	<0,00001	<0,00001	
<b>Calostro vs. L. Madura</b>	<0,00001	<0,00001	

Los valores se expresan en media ± desviación estándar (D.S.)

## V.RESULTADOS



### ii. Coenzima Q<sub>10</sub> en la leche materna

Al medir los niveles de Coenzima Q<sub>10</sub>, observamos (Tabla V-13 y Figura V-6) que:

- Los niveles en calostro no fueron significativamente diferentes entre los grupos. Tampoco se observaron diferencias significativas al comparar los niveles en leche de transición y leche madura intergrupos.
- Los niveles de esta sustancia en calostro disminuyeron ligeramente (no de forma significativa) de calostro a leche de transición, en ambos grupos.
- En ambos grupos, el contenido de CoQ<sub>10</sub> aumentó desde leche de transición a leche madura.

## V.RESULTADOS

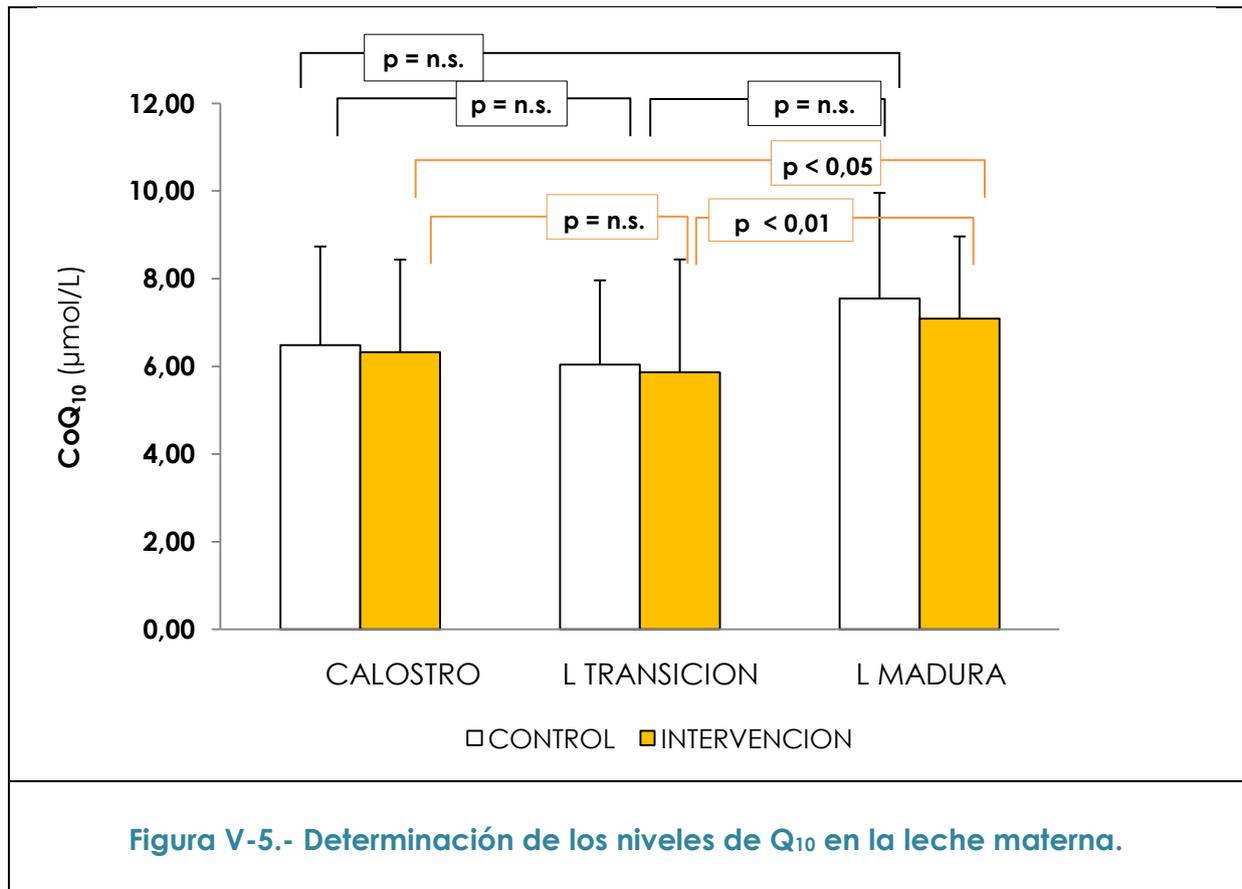
- Pero sólo en el grupo de intervención observamos niveles significativamente más elevados en leche de transición y leche madura.

**En resumen:** Aunque los niveles de CoQ<sub>10</sub> calostro disminuyeron inicialmente lo que resultó en niveles inferiores en leche de transición (aunque no significativamente diferentes en ninguno de los grupos) estos niveles aumentaron a partir de entonces, pero sólo de modo significativo en el grupo de intervención (Tabla V-13 y Fig. V-5).

<b>Tabla V-13. Contenido en CoQ<sub>10</sub> de la leche materna</b>			
	<b>CoQ<sub>10</sub> (µmol/L)</b>		
	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Intervención</b>	<b>P intergrupo</b>
<b>Calostro</b>	6,49 ± 2,25	6,32 ± 2,11	0,814
<b>L. transición</b>	6,04 ± 1,92	5,86 ± 2,58	0,797
<b>L. madura</b>	7,55 ± 1,74	7,09 ± 0,97	0,375
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Calostro vs. L. Transición</b>	0,409	0,271	
<b>L. Transición vs L. Madura</b>	0,062	0,001	
<b>Calostro vs. L. Madura</b>	0,126	0,049	

Los valores se expresan en media ± desviación estándar

## V.RESULTADOS



### C. DAÑO OXIDATIVO DEL LACTANTE

#### i. Lactantes (mediciones en orina).

##### a. Oxidación de proteínas.

Al cuantificar el contenido en grupos carbonilo en la orina de los lactantes para analizar la evolución del daño oxidativo a proteínas, observamos (Tabla V-14 y Figura V-7) que:

- Los niveles mostraron una tendencia decreciente, en ambos grupos, del día 2 al día 30, aunque solo en el grupo de intervención esta disminución fue significativa.

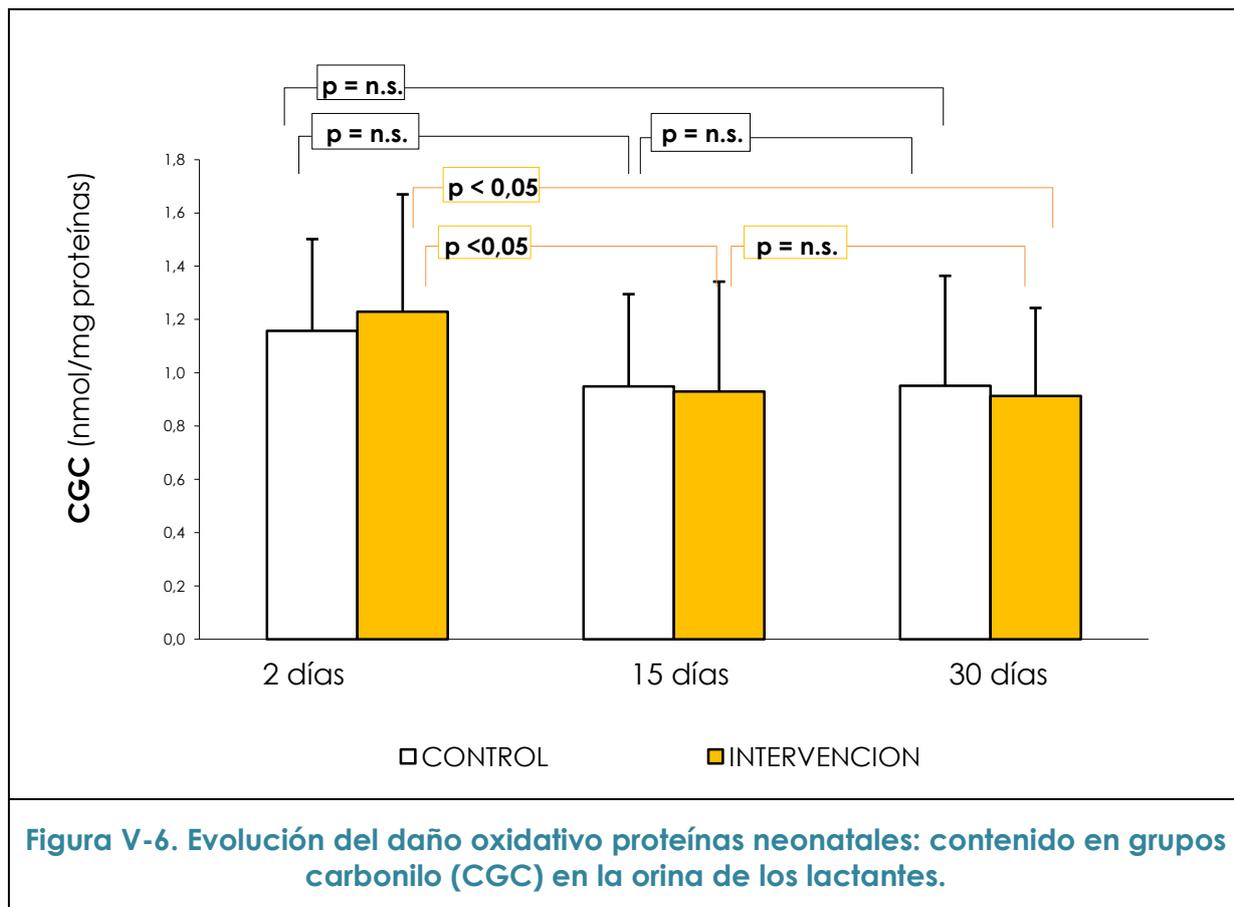
## V.RESULTADOS

- En la comparación de niveles del día 15 con el inicio solo en el grupo de intervención, la disminución fue significativa.
- No hubo cambios significativos en ninguno de los dos grupos al comparar la orina del día 30 con la orina del día 15.

**En resumen:** la recuperación del daño oxidativo a proteínas mostró signos de recuperación en ambos grupos pero sólo de modo significativo respecto los niveles iniciales en el grupo de intervención (Tabla V-14 y Figura V-6)

<b>Tabla V-14. Evolución del daño oxidativo neonatal infligido a proteínas, medido por contenido en grupos carbonilo (CGC) en la orina del lactante</b>			
	<b>CGC (nmol/mg proteínas)</b>		
	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Intervención</b>	<b>p intergrupo</b>
<b>Orina 2 día</b>	1,16 ± 0,34	1,23 ± 0,44	0,688
<b>Orina 15 días</b>	0,95 ± 0,35	0,93 ± 0,41	0,881
<b>Orina 30 días</b>	0,95 ± 0,41	0,91 ± 0,33	0,803
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Orina 2 vs 15 días</b>	0,15	0,05	
<b>Orina 15 vs 30 días</b>	0,99	0,90	
<b>Orina 0 vs 30 días</b>	0,21	0,04	
Los valores se expresan en media ± desviación estándar			

## V.RESULTADOS



### b. Oxidación de lípidos

Al analizar la evolución del contenido en MDA en la orina de los lactantes para estudiar la variación del daño oxidativo lipídico, observamos (Tabla V-15 y Figura V-7):

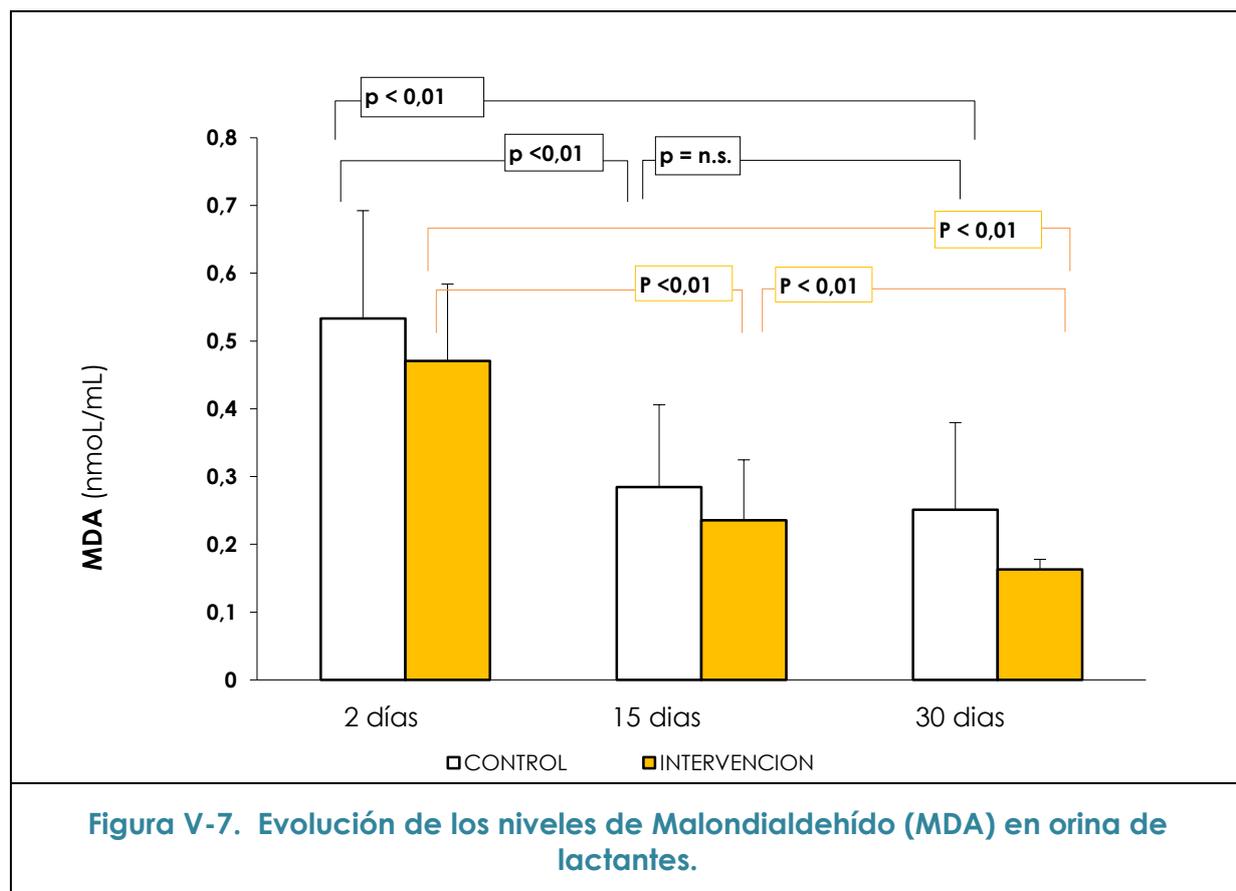
- una disminución en los niveles de MDA a lo largo del primer mes en ambos grupos.
- niveles significativamente menores en la orina de los lactantes a los 15 días de vida vs. 2º día, en ambos grupos.
- Niveles significativamente menores el día 30 vs día 15 sólo en el grupo de intervención.

## V.RESULTADOS

**En resumen:** La reducción de niveles de Malondialdehído en la orina de los lactantes se mantuvo decreciente de forma significativa desde el día 2 hasta el día 30 en ambos grupos. Los resultados fueron más mantenidos en el grupo de intervención.

<b>Tabla V-15. Evolución del daño oxidativo lipídico medido por MDA en la orina del lactante.</b>			
	<b>MDA en orina (nmol/mL)</b>		
	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Intervención</b>	<b>p intergrupo</b>
<b>Orina 2 día</b>	0,533 ± 0,16	0,471 ± 0,12	0,265
<b>Orina 15 días</b>	0,284 ± 0,12	0,235 ± 0,09	0,398
<b>Orina 30 días</b>	0,251 ± 0,13	0,163 ± 0,02	0,132
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Orina 2 vs 15 días</b>	<0,0001	<0,0001	
<b>Orina 15 vs 30 días</b>	0,514	0,01	
<b>Orina 0 vs 30 días</b>	<0,0001	<0,000	
Los valores se expresan en media ± desviación estándar			

## V.RESULTADOS



**Figura V-7. Evolución de los niveles de Malondialdehído (MDA) en orina de lactantes.**

### c. Oxidación de ADN.

Al analizar la evolución del contenido en 8OHdGuanosina (8OHdG) en la orina de los lactantes para estudiar la variación del daño oxidativo al ADN, observamos (Tabla V-16 y Figura V-8).

- El contenido de 8OHdG en la orina de los lactantes a lo largo del periodo de estudio disminuyó significativamente a lo largo del primer con recuperación del daño oxidativo a los 30 días en ambos grupos
- La disminución inicial de niveles (del día 2 al día 15) sólo fue significativa en el grupo de intervención.
- La disminución continuó del día 15 al 30 con niveles significativamente inferiores el día 30 en ambos grupos.

## V.RESULTADOS

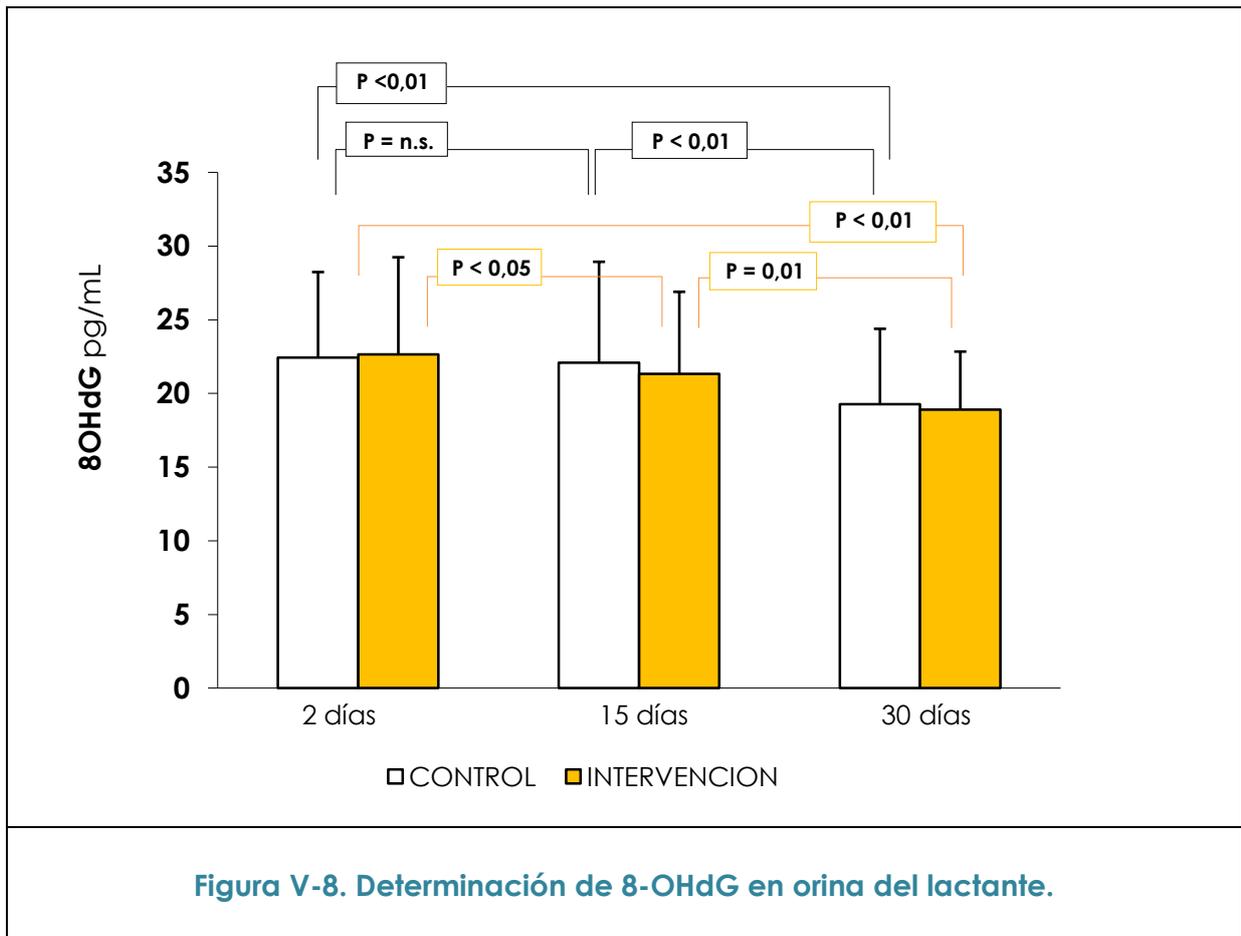
- La comparación de niveles entre grupos no demostró diferencias significativas en ningún momento del periodo estudiado.

**En resumen:** Ambos grupos mostraron una disminución significativa de niveles de 8-OHdG en orina al comparar los niveles del día 30 versus los del día 2, pero la reparación se inició significativamente antes en el grupo de intervención (Fig. V-8 y Tabla V-16).

<b>Tabla V-16. Evolución del daño oxidativo al ADN medido por niveles de 8-OHdG en orina del lactante.</b>			
	<b>8-OHdG en orina (pg/mL)</b>		
	<b>Grupo Control</b>	<b>Grupo Intervención</b>	<b>p intergrupo</b>
<b>Orina 2 día</b>	22,45 ± 5,8	22,66 ± 6,6	0,923
<b>Orina 15 días</b>	22,09 ± 6,8	21,32 ± 5,6	0,732
<b>Orina 30 días</b>	19,27 ± 5,1	18,9 ± 3,9	0,821
	<b>p</b>	<b>p</b>	
<b>Orina 2 vs 15 días</b>	0,782	0,026	
<b>Orina 15 vs 30días</b>	0,006	0,007	
<b>Orina 0 vs 30 días</b>	0,0002	0,002	

Los valores se expresan en media ± desviación estándar

## V.RESULTADOS



## V. RESULTADOS

## V. DISCUSSION



## VI. DISCUSSION

## VI. DISCUSIÓN

### 1. PORQUÉ UN ESTUDIO SOBRE LACTANCIA Y ANTIOXIDANTES EN LACTANTES SANOS

El metabolismo REDOX, los antioxidantes y el efecto de la oxidación sobre el envejecimiento celular, han sido motivo de amplias investigaciones, en el mundo científico, en las últimas décadas. Que una alimentación sana con un adecuado aporte de sustancias antioxidantes (como la dieta mediterránea) tiene importantes beneficios para la salud del adulto (Psaltopoulou, 2004; Estruch 2012; Codoñer, 2013; Sala-Vila, 2015), es un hecho bien conocido en la actualidad. Y, aunque los efectos del estrés oxidativo se asociaron inicialmente sólo con las enfermedades degenerativas y el envejecimiento, desde hace unos años se empieza a vislumbrar la importancia que pueden tener en la génesis de determinados problemas de salud en y desde la época neonatal. Hay bastante certeza de que en esta etapa el estrés oxidativo puede resultar especialmente grave para el neonato pretérmino y su participación es bien conocida en la génesis de problemas tan graves como la enterocolitis necrosante, la broncodisplasia o la retinopatía del prematuro (Tin, 2007). Y, aunque sin tanta evidencia todavía, se empieza a conocer que el estrés REDOX en estos momentos de inicio de la vida puede influir en la génesis de determinadas enfermedades de aparición posterior como la arterioesclerosis (Franco, 2007).

Por otra parte, existe evidencia científica de buena calidad que demuestra que, independientemente del medio socioeconómico, no amamantar contribuye a aumentar la mortalidad infantil, la hospitalización pediátrica, las tasas de diabetes y obesidad infantil y las de enfermedades del adulto como la enfermedad celiaca o la cardiovascular, además del riesgo de cáncer y diabetes en la madre (Black, 2008; Ip, 2007; Quigley, 2007; Smith, 2010; Horta 2013). Y para muchos de estos problemas se ha observado una relación “dosis respuesta” entre la cantidad y duración de la lactancia con los mejores resultados asociados a mayor duración y

## VI. DISCUSIÓN

exclusividad de la lactancia. Organismos científicos de todo el mundo como la Academia Americana de Pediatría de EEUU (AAP, 2012), el National Institute for Clinical Excellence del Reino Unido (NICE, 2014), o la Colaboración Cochrane (Renfrew, 2012) reconocen que la lactancia materna y el amamantamiento tienen un impacto fundamental sobre la salud infantil y materna a corto, medio y largo plazo (AAP, 2012).

Por otra parte, en las últimas décadas se han ido acumulando evidencias sobre el importante aporte de sustancias diversas con el que la leche materna contribuye al mantenimiento de la homeostasis REDOX en el recién nacido y el lactante (Hernández-Aguilar, 2013). Y, es interesante observar cómo muchas de las enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo también son más frecuentes en las personas que no fueron amamantadas (Smith, 2011). Es bien conocida la importancia que la leche materna tiene para el recién nacido pretérmino, al que la alimentación con lactancia artificial expone a importantes riesgos de morbilidad por procesos relacionados con desequilibrios del estado oxidativo, como la enterocolitis necrosante, la retinodisplasia, la broncodisplasia o la leucomalacia periventricular (Lee, 2011).

Todo esto induce a pensar que la conservación de la homeostasis oxidativa en las primeras épocas de la vida tiene importancia en la edad adulta, y que el estatus oxidativo de la leche materna puede jugar un importante papel en todo ello. La mayoría de los recién nacidos no nacen prematuros y, sin embargo, prácticamente no hemos encontrado investigación sobre la importancia del aporte antioxidante de la leche materna y su influencia sobre la salud, para los recién nacidos sanos y a término. Y todo ello nos indujo a realizar un estudio.

### 2. PORQUÉ ESTUDIAMOS LA DIETA MATERNA

Los estudios que demuestran la importancia del amamantamiento y la lactancia sobre la salud neonatal, infantil y del adulto, se han multiplicado en los últimos años y esto probablemente ha influido en un aumento de interés por el

## VI. DISCUSIÓN

estudio de la composición y propiedades de la leche materna. Y ello ha llevado al descubrimiento de componentes de la leche con propiedades funcionales y no exclusivamente nutritivas como compuestos antioxidantes, factores de crecimiento, inmunomoduladores (Turfkruyer, 2015), bacterias capaces de establecer un microbioma diferente (Fernández, 2013; Koleva, 2015), células madre pluripotenciales (Hassiotou, 2014) histonas y micro ARN (Irmak, 2012; Verducci, 2014; Alsaweed, 2015).

La influencia de la alimentación materna sobre la composición de su leche ha sido motivo de muchos estudios en décadas pasadas. Y, basados en ellos, las autoridades sanitarias y organismos de todo el mundo han establecido recomendaciones sobre ingesta de nutrientes para la mujer durante el periodo de embarazo y de lactancia. Pero, aun siendo bien conocida la influencia de la alimentación sobre el estatus oxidativo, no existe todavía un consenso sobre recomendaciones de ingesta para muchos antioxidantes, aunque sí para otros como las vitaminas, el selenio o el zinc (Otten, 2006, Silvestre, 2007). Por otra parte, la investigación sobre la influencia de la dieta en la composición de la leche materna ha sido muy escasa en las últimas décadas. Y, aunque se reconoce la importancia de asegurar el aporte adecuado de algunos nutrientes como el ácido fólico o el yodo en la dieta materna, hay muy pocos estudios sobre los hábitos dietéticos de la madre lactante, sobre la influencia de la dieta en la composición de la leche materna y mucho menos sobre la ingesta de antioxidantes en este grupo de población. Y, ello a pesar de que cada vez existe mayor interés y conocimiento sobre la importante influencia que la dieta tiene sobre nuestra salud en todas las etapas de la vida y quizá especialmente durante los primeros años (Barker, 2012; Verducci, 2014).

La reflexión sobre la importancia del aporte de antioxidantes al lactante a través de la leche materna, y las incógnitas sobre la influencia de la dieta materna en todo ello, nos llevó a interesarnos por el estudio de la variación que pudiera sufrir la capacidad antioxidante de la leche humana si la madre suplementaba su dieta con una bebida rica en antioxidantes.

## VI. DISCUSIÓN

Planteamos un diseño de grupo control y de intervención en el que sólo un grupo recibiría el suplemento, pero los estudios observacionales tienen como inconveniente la dificultad de controlar los efectos de múltiples factores que pueden influir en los resultados ajenos al factor estudiado. En nuestro caso es bien conocido que el estatus nutricional, entre otros factores, influye en las propiedades de la leche materna, por ello, era necesario en primer lugar valorar las diferencias existentes entre los grupos control y de intervención. Para ello comparamos las características somatométricas de las mujeres y de sus bebés, la composición en macro y micronutrientes de sus dietas, un estudio bioquímico inicial y el contenido y la capacidad antioxidante de sus leches al inicio del estudio (como grupo) así como el estatus oxidativo inicial de los lactantes (con mediciones en orina) de ambos grupos.

La somatometría de madres y bebés no objetivó diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados. El IMC medio en ambos grupos muestra una población con baja prevalencia de obesidad (en el grupo). Tras el estudio bioquímico no tuvimos que descartar a ninguna participante por motivo de alteración bioquímica y tampoco se objetivaron diferencias significativas entre los grupos, lo que por otra parte era de esperar porque partíamos de población sana. Tampoco encontramos, tal como puede observarse en la sección de resultados, grandes diferencias de ingesta de nutrientes.

Por otra parte, y dado que la dieta es fuente inagotable de antioxidantes y prooxidantes en un intento de acotar aún más el aporte extra de antioxidantes que ingeriría el grupo de intervención era preciso en primer lugar controlar el aporte "extra" de antioxidantes, y para ello, pedimos a las mujeres que no tomaran chocolate, café, té o complejos vitamínicos durante el periodo de estudio. Y además, era necesario controlar el efecto de confusión de un aporte desigual de antioxidantes sobre la composición de la leche de las mujeres estudiadas para lo que debíamos tener información sobre el consumo dietético de las mujeres en ambos grupos. La combinación de recuerdos y registros de 24 horas ha sido descrita, además, como un modo seguro de obtener una aproximación fiable al

## VI. DISCUSIÓN

consumo medio de la mayoría de los nutrientes y un buen método para determinar la ingesta media de un grupo (Shim, 2014). El recuerdo de 24 horas, cuando la información la recoge el profesional, permite un mayor detalle y precisión de las medidas y las formas de cocinado. El sesgo de recuerdo que conlleva este método es compensado por los registros (la información se recoge prospectivamente a medida que se consume) aunque se puede perder cierto detalle, al depender del autoregistro (Arab 2011). Por ello, decidimos utilizar ambos métodos, el recuerdo y el registro, porque como ha sido descrito (Shim, 2014) ambos se complementan y la recogida de información conjunta nos permitía mejorar la fiabilidad de la información obtenida. Así y como se ha descrito, en el apartado de métodos, obtuvimos información detallada sobre su alimentación con 9 registros dietéticos de 24 horas y 3 recuerdos de 24 horas. Se ha descrito que son precisos al menos 3 recuerdos o registros de 24 horas para poder caracterizar la dieta habitual de un sujeto de estudio (Otten, 2006); con 12 días de recogida de dieta, disponíamos de una buena herramienta, por tanto, para valorar la alimentación habitual de las mujeres participantes.

El análisis del contenido en nutrientes, se realizó con el programa BitasDE de la Universidad de Granada porque este programa contenía una de las bases de datos de composición de nutrientes de alimentos consumidos en España, más completa (Mataix J, 2009) en el momento de la realización de la investigación.

### 3. SOBRE LOS RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA DIETA MATERNA

El análisis de estos datos no mostró diferencias significativas en la ingesta de la mayoría de macro ni micronutrientes. Tan sólo observamos que las mujeres del grupo control tomaron una dieta más rica en vitamina C como grupo. Esto podría haber sesgado los resultados hacia una menor efectividad observada de la intervención. Sin embargo se ha descrito que para este nutriente, el contenido en leche no aumenta a partir de un determinado nivel umbral, aunque aumente la ingesta (Hoppu, 2005). La zona en la que viven las mujeres estudiadas, la

## VI. DISCUSIÓN

comunidad valenciana, es bien conocida como una zona en la que el consumo de frutas y verduras es más elevado que en otras regiones españolas y además es especialmente frecuente el consumo de cítricos ricos en vitamina C, por lo que muy probablemente, esta ingesta haya tenido poca influencia en los resultados de nuestro estudio.

Por otra parte, los resultados de este análisis de ingesta inicial resultaron en unos hallazgos que no esperábamos y que por inéditos, hemos creído necesario destacar. Contrariamente a lo que esperábamos, la dieta de las mujeres estudiadas (mujeres sanas, de nivel socioeconómico catalogado como medio-bajo), era deficitaria en muchos nutrientes y, desequilibrados en lo que respecta al aporte de macronutrientes, con un exceso de ingesta de grasas en detrimento de la ingesta de hidratos de carbono.

La ingesta calórica media de nuestras mujeres se situó en casi 2100 Kcal (Tabla V-3), el IMC media de las mujeres estudiadas se situó en 23,5 y sólo detectamos un 6% de obesidad en nuestra muestra (IMC >30 en peso al inicio de la gestación). No hubo diferencias significativas en la IMC entre grupos. En el estudio recientemente publicado por Varela y su equipo (Ruiz, 2015) sobre consumo de un grupo amplio de población española, las mujeres adultas del grupo estudiado con edades entre 18 y 64 años tuvieron un consumo medio de  $1675 \pm 437$  Kcal/día. Nuestras mujeres tuvieron una ingesta claramente superior, aunque si les quitáramos de la media de ingesta las 330 Kcal extras que se recomiendan para la mujer durante el primer trimestre de la lactancia, nos situaríamos en una media de 1760 Kcal, lo que teniendo en cuenta que nuestro grupo tiene un rango de edad más acotado que el de Varela, nos acercaría bastante a la ingesta descrita como habitual en la población española. Por otra parte comparamos, la ingesta media de las mujeres de nuestro grupo, con la ingesta descrita por el grupo de Quiles (Quiles, 2006) (realizado con mujeres lactantes de una zona geográfica y hábitos dietéticos muy similares a la nuestra, en las que se recogió la información dietética con varios registros dietéticos de 24 horas y en las que el análisis de composición nutricional fue realizado con el mismo programa) y los resultados de la comparación

## VI. DISCUSIÓN

pueden verse en la tabla VI-1. Para aproximarnos mejor a la comparación con las mujeres del estudio de Quiles, realizamos una estandarización del consumo de nutrientes: el de macronutrientes se estandarizó al consumo de Kcal; los de vitaminas liposolubles y el colesterol a la ingesta de grasa y los de fibra y vitamina C al de hidratos de carbono. En comparación con las mujeres del grupo de Quiles, las de nuestro estudio, consumieron menos calorías de media y su IMC medio también fue menor.

<b>Tabla VI-1. Ingesta media, comparación con resultados publicados por Quiles.(Quiles, 2006)</b>				
Nutrientes	Nuestro grupo (todas las madres)		Quiles (2006) grupo a término	
	$\bar{x} \pm DS$	Datos estandarizados	$\bar{x} \pm DS$	Datos estandarizados
<b>Kcal</b>	2094 $\pm$ 358		2466 $\pm$ 334	
<b>HC</b>	249,4 $\pm$ 55,6	44,5	285,2 $\pm$ 80,4	46,2
<b>Proteínas</b>	99,2 $\pm$ 19,7	19,1	103,4 $\pm$ 15,4	16,7
<b>Grasa</b>	83,9 $\pm$ 20	36,5	103,8 $\pm$ 22,2	38,0
<b>Fibra (g)</b>	19,0 $\pm$ 5,6	7,8	19,9 $\pm$ 5,4	7,0
<b>Colesterol (mg)</b>	321,9 $\pm$ 95,4	383,2	399,9 $\pm$ 138,1	384,5
<b>Vit. A (<math>\mu</math>g)</b>	782,2 $\pm$ 349,6	93,1	996,6 $\pm$ 395,5	95,8
<b>Vit. C (mg)</b>	114,9 $\pm$ 60,9	46,9	148,3 $\pm$ 91,9	52,0
<b>Vit. E (mg)</b>	9,8 $\pm$ 5,5	11,7	6,1 $\pm$ 0,9	5,9

Los datos de consumo medio se estandarizaron al consumo de calorías, los de colesterol y vitaminas liposolubles al consumo de grasa y los de fibra y vitamina C al consumo de hidratos de carbono (de cada grupo, sobre los resultados medios totales); g:gs, mg: miligramos; mcg: microgramos

Aunque las RDI establecen el rango máximo tolerable en el 35%, son más habituales las recomendaciones de mantener el porcentaje de Kcal aportado por

## VI. DISCUSIÓN

las proteínas, no superior al 15% para la población general. Los resultados del análisis de la ingesta de macronutrientes en las mujeres de nuestro estudio, mostraron que un elevado porcentaje de mujeres tuvieron un consumo habitual de proteínas (expresado en porcentaje de Kcal) por encima del 15% aunque ninguna mujer consumió por encima del 35%. El grupo de Varela tiene una ingesta media ligeramente inferior al nuestro (17% frente a 19% en nuestro grupo). Por otra parte, y aunque la ingesta media de proteínas de nuestro grupo está por encima de lo referido para la población general en otros países europeos (Elmafda, 2009), este hecho, probablemente refleje una ingesta diferente durante la lactancia. Respecto al grupo de Quiles (Quiles, 2006), las mujeres de nuestro grupo también consumieron más proteínas.

Con respecto a los hidratos de carbono (HC), en nuestro grupo la media de consumo de HC se situó alrededor del 45%, cifra muy similar al descrito por Quiles, mientras que las mujeres que participaron en el estudio de Varela tuvieron un consumo medio de 41%. Este consumo más elevado probablemente refleja en parte el consumo más habitual de arroz y bollería que caracteriza a la dieta de la zona mediterránea. A pesar de ello, sólo un 58% de las mujeres mostraron un consumo adecuado de Kcal en forma de carbohidratos. Este bajo consumo de carbohidratos y especialmente de carbohidratos poco refinados ya ha sido descrito por otros autores para población española pero no de mujeres en fase de lactancia.

Respecto al aporte de Kcal procedente de las grasas, el consumo medio estuvo muy por encima del 30% recomendado como saludable (FESNAD, 2010; Otten, 2006; Silvestre, 2013). Las mujeres de ambos grupos realizaban una dieta descompensada (Figura V-1 y Figura V-5). Este desequilibrio fue algo mayor en el grupo control (mayor porcentaje de grasa y menor de hidratos de carbono) pero las diferencias en este aspecto entre los grupos no fueron significativas. Sin embargo nuestras mujeres mostraron un consumo medio de grasas inferior al descrito por Quiles (38%) y Varela (39%). En Europa la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) (EFSA, 2010) considera que no existen suficientes datos para

## VI. DISCUSIÓN

definir un nivel inferior o superior recomendados de consumo de grasa aunque algunos grupos han propuesto un nivel inferior del 20% y superior del 35% similares a las recomendaciones americanas (Ottens, 2006), de la OMS y de la FAO (FAO, 2010). Se observó además un consumo desequilibrado de ácidos grasos entre las mujeres estudiadas a costa especialmente de un consumo excesivo de AGS y de AGM, en detrimento del consumo de AGP. Este hecho es importante dada la repercusión que puede tener en la composición de la leche de las madres (Yahvah KM, 2015) y en la salud de las mujeres jóvenes. Especialmente porque sabemos que la composición en ácidos grasos de la leche materna varía en relación con la composición grasa de la dieta materna, Y por el papel esencial de estos compuestos sobre el desarrollo de tejido nervioso y como inmunomoduladores y mediadores inflamatorios (Delplanque B, 2015).

Por otra parte, observamos que muchas de estas mujeres, con un ritmo de vida acelerado y familias nucleares, tenían muy poco tiempo para preparar comida en casa y consumían muchos alimentos precocinados y poco sanos. Este hecho, ya ha sido descrito por otros autores en población general (Serra-Majem M, 2007; García-Arenzana N, 2011) y parece reflejar el abandono progresivo, en las últimas décadas, de los buenos hábitos alimentarios entre nuestras mujeres que se alejan de la dieta mediterránea, tan beneficiosa y tan nuestra (hasta hace unas décadas). Al comparar nuestros resultados con los resultados del grupo de Quiles (Tabla VI-2) (Quiles, 2006) mediante un cálculo del consumo medio de ácidos grasos (expresado por 100 g. de grasa ingerida) observamos que el consumo representa un patrón mucho menos sano que el de las mujeres del estudio de Quiles. Aunque el % de consumo de colesterol parece similar, el consumo relativo de grasas saturadas y monoinsaturadas es mucho mayor en nuestro grupo a cambio de un menor consumo relativo de ácidos grasos poliinsaturados. Sin embargo nuestro grupo consumió mucha más vitamina E. Estos cálculos, no obstante, deben ser tomados como orientativos dado que se han realizado sobre los datos agrupados.

## VI. DISCUSIÓN

<b>Tabla VI-2. Ingesta diaria de grasas: total, colesterol, vit E y Acidos grasos</b>				
Nutrientes	Nuestro grupo (todas las madres)		Quiles (2006) grupo a término	
	$\bar{x} \pm DS$	<b>g/100 g. grasa</b>	$\bar{x} \pm DS$	<b>g/100 g. grasa</b>
<b>Kcal</b>	2094 ± 358		2466 ± 334	
<b>Grasa</b>	84 ± 20	<b>36</b>	104 ± 22	<b>38</b>
<b>Colesterol (mg)</b>	322 ± 95	<b>383</b>	400 ± 138	<b>385</b>
<b>Vit. E (mg)</b>	9,8 ± 1	<b>12</b>	6,1 ± 0,9	<b>6</b>
<b>AGM (g)</b>	32	<b>45</b>	48	<b>55</b>
<b>AGP (g)</b>	10	<b>14</b>	14	<b>16</b>
<b>AGS (g)</b>	30	<b>42</b>	25	<b>29</b>

(Calculada para los resultados publicados por Quiles (Quiles, 2006) y para nuestro grupo sobre los datos totales para hacer más homogénea la comparación). AGM: Acidos grasos monoinsaturados, AGP: Ácidos grasos poliinsaturados, AGS: Ácidos grasos saturados.

Los datos de consumo medio se estandarizaron al consumo de calorías, los de colesterol y vitaminas liposolubles al consumo de grasa y los de fibra y vitamina C al consumo de hidratos de carbono (de cada grupo, sobre los resultados medios totales)

Para evaluar la prevalencia de consumos inadecuados decidimos comparar las ingestas estimadas como habituales, con las estimaciones medias de requerimientos (EMR) publicadas en 2006 por la National Academy of Sciences de los EEUU (Otten, 2006), porque son estimaciones de la cantidad de nutriente cuya ingesta aseguraría las necesidades del 50% de la población. Para la población española no se han publicado EMR, aunque sí RDI, publicadas por el grupo de Silvestre (Silvestre, 2007). Pero las RDI no deben utilizarse para analizar la dieta de grupos, porque la comparación con ellas, expone al riesgo de sobreestimación de déficits (Otten, 2006). Las RDI o recomendaciones dietéticas de ingesta, son estimaciones de la cantidad de nutriente que es capaz de asegurar la ingesta adecuada del 95% de la población. Por esto, se recomienda utilizar las EMR para el estudio de la ingesta de grupos, debido a que al comparar la ingesta media o

## VI. DISCUSIÓN

habitual de los individuos de un grupo con estos, aquellos individuos que necesitan menos del aporte medio (superestimaciones), quedan equilibradas con las infraestimaciones (aquellos que necesitarían más). Así comparando con estos valores es posible aproximarse con bastante fiabilidad a la prevalencia de ingestas inadecuadas en el grupo, mientras que la comparación con los RDI sobreestimaría la proporción del grupo en riesgo de ingesta inadecuada (Otten, 2006).

Como puede observarse en la tabla de resultados (Tabla V-7) la prevalencia de ingestas probablemente deficitarias es elevada para muchos nutrientes. Con las dietas consumidas, más de un 95% de las mujeres estaban en riesgo de consumo deficitario de Acido Fólico y casi un 90% del de vitamina E. Casi un 75% consumían Vitamina A probablemente por debajo de sus necesidades, y más de un 65% no tenían cubiertas sus necesidades de cinc. Los requerimientos medios de vitamina C y de cobre no fueron alcanzados por más del 40% de las mujeres.

Algunos autores ya han alertado sobre el riesgo de aportes insuficientes en la dieta habitual de las mujeres lactantes, para algunos nutrientes como la tiamina, riboflavina, vitamina B-6, B-12, vitamina A y yodo (Allen, 2005). En nuestro grupo, observamos un escaso riesgo de déficit para la vitamina B2, la niacina o la vitamina B12. Un 25% de las mujeres consumían menos vitamina B6 de lo recomendado, y como se ha comentado, el consumo de ácido fólico fue deficitario prácticamente en todas las mujeres. Este hecho quedaría paliado por la práctica habitual de suplementar la dieta de la mujer embarazada y lactante con suplementos vitamínicos y especialmente con ácido fólico. Y es importante dadas las devastadoras consecuencias que el déficit de esta vitamina en la mujer durante las primeras etapas de la gestación pueden tener sobre el desarrollo fetal (Greenberg, 2011).

Al valorar la prevalencia de ingestas de riesgo por exceso, observamos que casi un 50% de las mujeres consumía una dieta excesivamente rica en sodio, más de un 40% consumía un exceso de magnesio y casi un 40% consumía excesivo manganeso (Tabla V-8).

## VI. DISCUSIÓN

Sobre las necesidades nutricionales de la mujer lactante continúa habiendo muchos interrogantes (Berti, 2014). Aunque la OMS avisa de la importancia del control del estado nutricional y de la ingesta de la mujer lactante para la salud materno infantil, esta vigilancia no es una práctica habitual. Nuestros datos invitan a la reflexión ya que en el grupo estudiado, se detectó una prevalencia elevada de dietas deficitarias. Y eso que las mujeres pertenecen a un grupo de población que según algunos autores come más fruta y verdura que otros (Villar-Vidal, 2015).

Se sabe que son necesarios déficits graves para que la dieta materna ponga en peligro la composición de la leche materna. Sin embargo un déficit nutricional puede influir negativamente en la salud de la propia madre y también, de algún modo sobre las características de la leche y el contenido de determinados nutrientes, por ejemplo los antioxidantes. Y, sin embargo, existen muy pocos estudios recientes publicados sobre la dieta de las mujeres lactantes. Estos hechos y, a pesar de que el tamaño y el tipo de muestra de nuestro estudio no permiten sacar conclusiones generalizadas, deberían alertar sobre la necesidad de valorar y asesorar adecuadamente a las mujeres sobre su dieta en esta etapa de su vida. Los resultados obtenidos quizá podrían orientar las recomendaciones dietéticas, dirigidas a las madres lactantes.

### 4. PORQUÉ ELEGIMOS LA CERVEZA SIN ALCOHOL COMO SUPLEMENTO

Hasta hace unos años la cerveza era considerada una bebida buena para la madre que amamantaba. Además, era popularmente conocida en nuestra tradición (y en la de otros países) como una bebida de efectos beneficiosos para la madre que amamanta (Olalla J, 2001; Nelson M, 2004). Los estudios demuestran que la cerveza contiene más de 200 compuestos diferentes, entre ellos: ácido fólico, vitaminas del grupo B, compuestos polifenólicos y melanoidinas (Valls, 2001; Valls, 2005; Rivero, 2005; Martínez-Álvarez, 2009, Valls-Bellés, 2010; Codoñer-Franch, 2013)). Por otra parte, la tradición de muchos países le reconoce propiedades galactogógicas (la cerveza hace leche) aunque hay pocos estudios sobre el tema.

## VI. DISCUSIÓN

Sólo hemos encontrado un estudio publicado al respecto que describe que la cerveza puede aumentar los niveles de prolactina (Koletzko, 2000).

La cerveza dejó de considerarse una bebida adecuada para la madre que amamanta al descubrirse que el alcohol pasaba a la leche materna (Hastrup, 2014) y que su ingesta podía causar efectos perjudiciales al lactantes. El alcohol tiene un peso molecular de 46 Dalton (bajo) y presenta un índice leche plasma de 1,4 (se concentra en la leche), con un Tmax de 0,3-1,5 horas y un tiempo medio de eliminación de 0,3 horas. Su biodisponibilidad oral para el lactante es del 100% (Sachs, 2013; Hastrup, 2014; Reece-Stremtan, 2015). El consumo crónico de alcohol durante la lactancia puede causar sedación, desmedro, irritabilidad y retraso de desarrollo psicomotor en el lactante. Y el consumo materno agudo de cerveza puede sedar al lactante e inhibir la secreción de oxitocina y disminuir el reflejo de eyección y la secreción de leche entre un 10 y un 25%. Un estudio observó que el consumo de cerveza con alcohol altera las cualidades sensoriales de la leche materna. Además los bebés tomaron menos leche cuando sus madres tomaron cerveza con alcohol que cuando la tomaron "sin", aunque no hubo diferencia en el número de tomas que realizaron los lactantes. Las madres no fueron conscientes de que sus bebés tomaron menos leche con la cerveza con alcohol (Mennella, 1993). Por todo ello la cerveza (con alcohol) es considerada en la actualidad, como sustancia de consumo con riesgo de nivel 2/3 (poco seguras y desaconsejadas).

Varios estudios han demostrado que la cerveza sin alcohol conserva gran parte de las características nutricionales de la cerveza tradicional y es rica en antioxidantes especialmente polifenoles y otros flavonoides, además de minerales como el selenio (Martínez, 2007; Valls-Bellés, 2008; Martínez, 2009; Valls-Bellés, 2010). Además, se ha descrito que también mantiene el efecto galactogogo de la cerveza (Koletzko, 2000). Por otra parte, ya en el año 93, Mennella (Menella, 1993), describe pequeñas variaciones sensoriales (de olor) en la leche de las madres tras el consumo de cerveza "sin alcohol", aunque describe que los lactantes del experimento no mostraron cambios en su patrón de ingesta y los análisis bioquímicos no detectaron contenido alcohólico en la leche. Menella, no pudo descartar la

## VI. DISCUSIÓN

presencia de pequeñas cantidades de alcohol en la leche tras la ingesta de cervezas sin alcohol (la cerveza utilizada contenía alcohol: 0,4%) y calcularon una dosis de contenido aproximado posible, en leche, de aproximadamente 3 mg/dL (40 ppm) pero no detectaron contenido alcohólico en las muestras de leche analizadas. Recientemente, se ha publicado que tras la ingesta de una cantidad no despreciable de cerveza sin alcohol (1,5 L), tan sólo una pequeña proporción de las muestras de leche de las madres lactantes mostró niveles traza (máximo de 0,0021 g/L), y ello solamente cuando fueron tomas inmediatamente después de la ingesta, pero nada en las muestras tomadas con más de una hora de tiempo tras la toma. Esto parece confirmar la inocuidad de esta bebida para el lactante (Schneider, 2013). Por todo lo expuesto: propiedades nutricionales, calidad antioxidante, popularidad entre las mujeres lactantes, posibles efectos beneficiosos e inocuidad demostrada para el lactante, consideramos a la cerveza sin alcohol como una bebida adecuada para comprobar nuestra hipótesis.

### 5. SOBRE LOS MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE

La capacidad antioxidante total (CAT) es una medida de la capacidad de la leche materna para controlar el desequilibrio REDOX. Este parámetro no solo recoge la suma de actividades de los diversos antioxidantes conocidos, sino también de los desconocidos y de las interacciones entre todos ellos. Por eso la medición de la capacidad antioxidante se ha descrito como un indicador sensible que permite detectar pequeñas diferencias mucho mejor que las mediciones de los antioxidantes por separado (Turoli, 2009). Para medirla y determinar sus variaciones a lo largo del tiempo y en cada grupo y para mejorar la capacidad de detectar diferencias en función de la suplementación, decidimos utilizar 3 métodos diferentes. Cada método mide la capacidad antioxidante de compuestos bioactivos diferentes con capacidades antioxidantes variables y con acciones sinérgicas en muchos casos (unos miden la capacidad de donar electrones a un determinado RL, otros la habilidad para detener algún tipo de fuente de inicio de

## VI. DISCUSIÓN

oxidación, la quelación de un metal de transición o la absorción de radiación ultravioleta). Los resultados obtenidos con diferentes métodos en una misma muestra, suelen por tanto, obtener resultados diferentes ya que determinan acciones antioxidantes diversas. Dado que en la leche, como se ha visto previamente coexisten diversas sustancias antioxidantes, con capacidad para interaccionar entre sí (Friel, 2011), con mecanismos todavía no del todo conocidos, era de esperar que los distintos métodos obtuvieran resultados diferentes, lo que por otra parte ya había sido descrito por otros (Janaszewska, 2002).

Tampoco se ha observado una relación directa con el contenido de determinados antioxidantes y la capacidad antioxidante total (Vaya, 2011). Algunos autores han observado una ausencia de correlación entre los valores medidos de capacidad antioxidante por dos métodos (ABTS<sup>•+</sup> y DPPH) y han sugerido 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. Por ejemplo el DPPH no mide adecuadamente el efecto antioxidante de los carotenoides que pudieran estar presentes en la leche estudiada (Martysiak, 2012). El FRAP mide especialmente bien la actividad antioxidante de compuestos como el ácido ascórbico, el alfa tocoferol, el ácido úrico, la bilirrubina y los compuestos fenólicos pero no la de proteínas, glutatión o ácido lipóico (Benzie, 1999).

Todo esto nos llevó a utilizar más de un método en los análisis y a utilizar 3 métodos ampliamente utilizados por otros autores para la medición de la capacidad antioxidante de la leche humana. El empleo de varios métodos obtiene diferentes resultados como consecuencia de la medición de diferentes componentes e interacciones entre los mismos. Por ello, consideramos que la valoración de esta capacidad antioxidante, con diferentes métodos, es útil y permite evaluarla mejor, especialmente si esta valoración está destinada a detectar diferencias tras intervenciones como en nuestro caso.

### 6. SOBRE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA

## VI. DISCUSIÓN

Al analizar los resultados obtenidos sobre la capacidad antioxidante de la leche madura con el método ABTS<sup>•+</sup>, nuestros valores fueron superiores a los publicados para mujeres portuguesas (399  $\mu\text{mol/L}$ ) (Matos, 2009) o Polacas (381,84  $\mu\text{mol/L}$ ) (Martysiak-Zurowska, 2012) y similares a los publicados por los italianos ((3818  $\mu\text{mol/L}$ ) (Turoli, 2004). Los valores determinados en nuestras mujeres se asemejan a los descritos en las mujeres italianas en lo que probablemente influye la similitud de la alimentación de nuestras poblaciones.

Con el método DPPH los autores polacos (Martysiak-Zurowska, 2012) observaron niveles medios en leche de transición (25,23  $\mu\text{mol/100 mL}$ ) muy semejantes a los encontrados en la leche de transición de nuestro grupo control y algo inferiores a los del grupo de intervención (28,33  $\mu\text{mol/100 mL}$ ).

Con el método FRAP, Zarban (Zarban, 2009) obtuvo valores muy inferiores a los de la leche de las mujeres de nuestro grupo control, tanto en calostro (1,06  $\text{mmol/L}$  vs 3,21  $\text{mmol/L}$ ) como en leche madura (0,82  $\text{mM/L}$  frente a 2,49  $\text{mM/L}$ ). Y desde luego muy inferiores a los de la leche madura de las mujeres suplementadas (3,18  $\text{mM/L}$ ).

Podemos resumir por tanto que la capacidad antioxidante de las mujeres de nuestro estudio fue superior a la publicada para mujeres portuguesas, polacas o la iraníes, y son más parecidos a la medida entre las mujeres italianas. A pesar de que ningún grupo de los nombrados tiene muestras suficientemente amplias ni representativas de la población general, los resultados son congruentes con los tipos de alimentación, previsiblemente más ricos en alimentos con contenido antioxidante elevado en la población italiana y española (verduras y frutas frescas y aceite de oliva).

Nuestros resultados indican que la leche humana contiene antioxidantes y una capacidad antioxidante total que es el resultado no sólo de la concentración de antioxidantes sino de las interacciones entre los mismos. Algunos han argumentado que la capacidad antioxidante total y el contenido antioxidante de la leche humana estarían destinados principalmente a proporcionarle estabilidad y protegerla frente al enranciamiento de sus compuestos. Sin embargo conviene

## VI. DISCUSIÓN

recordar que la leche es un líquido vivo, producido prácticamente mientras se consume. Por ello, es muy probable su contenido antioxidante esté dirigido a la protección antioxidante del neonato cuyas defensas en este aspecto son todavía inmaduras (incluso en el recién nacido a término sano).

### 7. SOBRE LAS VARIACIONES DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE HUMANA

Los valores de la CAT de la leche en el grupo control, fueron superiores en calostro respecto a la de la leche de transición (15 días) y a los de la leche madura (30 días) en el grupo control. Esta disminución de CAT fue constatada con los tres métodos utilizados. Con ello nuestros resultados ratifican los de numerosos autores que han observado una disminución de la CAT de la leche materna a lo largo del tiempo (Nykniaz, 2013; Zarban, 2009, Li, 2009; Ezaki, 2008; Mataix, 2008; Quiles, 2006; Meneses, 2005, Alberti-Fidanza, 2002).

La capacidad antioxidante de la leche humana en las mujeres de nuestro grupo control disminuyó, a lo largo del primer mes, de modo similar a lo descrito por otros, lo que parece ratificar el hecho de que la capacidad antioxidante de la leche humana, disminuye a lo largo del primer mes postparto, en las madres sanas con recién nacidos a término, si no se realiza ninguna intervención.

### 8. SOBRE LA INFLUENCIA DE LA SUPLEMENTACIÓN EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE

El método ABTS<sup>••</sup> mide la capacidad de la leche de donar electrones a un radical libre (ABTS<sup>••</sup>) pero tiene el inconveniente de obtener valores con rangos muy estrechos, lo que limita el análisis estadístico especialmente cuando el número de muestras no es grande (Ezaki, 2007). Con este método la CAT del calostro fue significativamente superior a la de la leche de transición y a la de la leche madura, en ambos grupos (Tabla V-9 y Figura V-1).

El método DPPH, aunque mide igualmente la capacidad de donar electrones a un radical libre, es una técnica con un rango más amplio de valores en

## VI. DISCUSIÓN

los resultados y por ello permite valorar mejor las diferencias cuando se comparan grupos o intervenciones (Ezaki, 2007). Con este método observamos que en el grupo de mujeres que había suplementado su dieta, la CAT del calostro se mantuvo estable a lo largo del primer mes y no se observó disminución significativa de la misma ni en la leche de transición ni en la leche madura. Sin embargo en el grupo control sí se constató, con este método también, una disminución de la capacidad antioxidante de la leche a lo largo del primer mes que resultó en una capacidad antioxidante significativamente inferior en la leche madura respecto a la del calostro.

Al valorar la evolución de la capacidad antioxidante a lo largo del primer mes con el método FRAP, constatamos igualmente, y de modo similar a lo observado por otros autores (Zarban, 2009), una disminución de la capacidad antioxidante en la leche de ambos grupos con valores significativamente inferiores en leche madura respecto al calostro. La disminución de la capacidad antioxidante se observó ya en los primeros 15 días, con valores significativamente más bajos en la leche de transición respecto al calostro en ambos grupos, pero en el grupo suplementado la capacidad antioxidante total de la leche de transición no continuó disminuyendo y se estabilizó después de los primeros 15 días.

Estos resultados parecen indicar que la suplementación de la dieta materna con una bebida rica en antioxidantes como la cerveza sin alcohol podría tener efectos positivos sobre la capacidad antioxidante total de la leche materna a lo largo del tiempo. Hallazgos similares han sido descritos por otros autores en relación con la ingesta de suplementos vitamínicos (Alberti-Fidanza, 2002) o de simbióticos (Nykniaz, 2013).

Podríamos resumir diciendo que la suplementación de la dieta materna con una bebida rica en antioxidantes, como la cerveza sin alcohol, durante el primer mes postparto, mejoró significativamente la capacidad antioxidante de la leche humana. Y estos resultados podrían indicar que la disminución de la capacidad antioxidante total de la leche humana a lo largo del primer mes postparto puede ser debida a un agotamiento de las reservas maternas destinadas a la reparación

## VI. DISCUSIÓN

de su propio daño, más que a una supuesta menor necesidad del lactante. Se ha observado que los efectos del daño oxidativo en la época neonatal pueden mantenerse en el tiempo y ser detectados hasta 13 años después (Franco, 2007), por ello, estos aspectos de nuestro estudio podrían ser relevantes.

### 9. SOBRE EL CONTENIDO ANTIOXIDANTE DE LA LECHE HUMANA: POLIFENOLES Y COQ<sub>10</sub>

El contenido en polifenoles disminuyó en la leche de las madres en ambos grupos desde la fase de calostro a la leche madura. Esto puede indicar que, o bien el cuerpo materno no los consideraba necesarios para la defensa neonatal o que los antioxidantes extras proporcionados por la cerveza no fueron suficientes. Existen muy pocos estudios sobre la presencia de polifenoles en la leche humana, Algunos autores han demostrado la presencia en leche de isoflavonas tras el consumo materno de leche de soja o tofu. Así como, la relación dosis respuesta entre el consumo y la concentración en leche y la aparición así mismo de estos compuestos en la orina neonatal (Frankie, 2006). Li determinó el contenido en polifenoles en 6 muestras de leche materna pero su objetivo era comparar el contenido con el de leches de fórmula (Li, 2009) y Vázquez determinó el contenido en polifenoles en la leche de 10 mujeres mejicanas con el objetivo de validar un nuevo método de extracción (Vázquez, 2015). Un estudio reciente analizó el contenido de diversos flavonoides (epicatequina naringenina, kaempferol o quercetina entre otros) en la leche humana de 17 mujeres, madres de recién nacidos a término y, salvo para el kaempferol, no se observaron variaciones en sus concentraciones en la leche a lo largo del primer mes. No obstante estos autores no estudiaron el contenido total en polifenoles (Song, 2013). A pesar de que el interés sobre el estudio del contenido en polifenoles de distintos alimentos es creciente, el estudio de su presencia en la leche humana es todavía escaso. Sin embargo se conoce que los polifenoles tienen importantes acciones: antioxidantes, antiinflamatorias, inhibición de la agregación plaquetaria, inmunológicas e incluso de protección de la molécula del ADN (Babbar, 2015). Y conviene no olvidar que la leche es la única fuente de polifenoles

## VI. DISCUSIÓN

en las primeras etapas de la vida. Nuestro estudio es el primero en analizar no sólo el contenido en polifenoles de la leche, sino su evolución a lo largo del tiempo y la relación de su concentración en leche con ingestas extras en la dieta materna.

Los primeros estudios sobre la evolución de los niveles de CoQ10 en leche humana fueron publicados por Quiles (Quiles, 2006). En un estudio con una muestra muy similar a la nuestra, de mujeres españolas con recién nacidos a término, describieron niveles de CoQ10 en calostro, muy similares a los de nuestras madres ( $6,97 \pm 0,53 \mu\text{Mol/L}$ ), aunque inferiores ( $4,21 \pm 0,5 \mu\text{Mol/L}$ ) en leche madura (en el grupo de RN a término).

Las mujeres de nuestro estudio mostraron una tendencia hacia niveles inferiores en leche de transición, disminución que, sin embargo, no fue significativa en ninguno de los dos grupos. Pero después de los 15 días, observamos un aumento de los niveles de CoQ10, y su concentración media fue superior en leche madura a la concentración media medida en calostro.

Tras el estudio de Quiles no hemos encontrado más estudios sobre la evolución de los niveles de CoQ10 en leche humana que pudieran verter alguna luz sobre estos hallazgos y las diferencias de tendencia encontradas entre nuestro grupo y el de Quiles. Las mujeres estudiadas por Quiles tenían un IMC medio superior (de  $26 \pm 0,4$ ) y su ingesta calórica media, así como la ingesta total de grasas fue muy superior a la encontrada por nosotros, aunque no la ingesta relativa (como % de Kcal). Si calculamos, de los datos publicados por Quiles, el % de aporte de cada tipo de ácidos grasos respecto a la ingesta total de grasa y lo comparamos con la ingesta determinada en nuestro grupo, observamos que nuestras madres tomaron mayor proporción de ácidos grasos saturados y menos poliinsaturados y monoinsaturados que el grupo de Quiles. Lo que quizá pudiera tener alguna influencia en las diferencias observadas en los niveles de CoQ10. No hemos encontrado sin embargo literatura al respecto.

A pesar, sin embargo, de que se observó una tendencia al aumento de los niveles de CoQ10 en ambos grupos, sólo en el grupo de intervención estas diferencias fueron significativas. Sólo este grupo mostró niveles significativamente

## VI. DISCUSIÓN

superiores en leche de transición y leche madura frente al contenido en calostro. Además las concentraciones iniciales no fueron significativamente diferentes entre los grupos en la leche de calostro ni en la leche madura.

La CoQ10 es el antioxidante lipofílico más importante, protege de la oxidación al ADN y puede, por tanto, afectar a la expresión de los genes. Inhibe la oxidación protéica y su ingesta se ha relacionado con protección hepática, con acción directa antiaterogénica, con mejoras de la funcionalidad cardiaca e incluso con neuroprotección (Quiles, 2005; Litarru, 2007; Jing, 2015).

Un contenido más elevado de CoQ10 en calostro puede ser la respuesta a las necesidades elevadas del neonato tras el nacimiento (Ochoa, 2007). La disminución posterior derivaría entonces del gasto inicial de reservas maternas. El aumento que se observa en la leche madura con niveles significativamente superiores de Q10, podría interpretarse como que la madre, tras un primer período ha vuelto a la estabilización y al precisar menor cantidad de antioxidantes para su propia defensa, puede disponer de ellos para el aporte en la leche.

Conviene recordar, por otra parte, que el CoQ10 es sintetizada endógenamente, aunque su suplementación dietética se ha relacionado con un mejor estatus REDOX, con la reparación de daños derivados de estrés oxidativo y con la protección de los daños causados por UVB y ROS (Jing, 2011).

Los niveles de CoQ10 han sido relacionados por diversos autores de modo directo con la capacidad antioxidante total de la leche humana (Quiles, 2006; Li, 2009) y la administración exógena de Co Q10 se ha asociado a una mejora en la respuesta inmune (Bentinger M, 2003). Por otra parte, se ha observado un incremento en los niveles de CoQ10 del nacimiento a los 20 años con descensos variables posteriores y según los tejidos, de modo que los niveles al nacimiento igualan a los encontrados en personas de 80 años (Quiles, 1999). Por tanto la preservación o incremento de los niveles de CoQ10 neonatales pueden tener influencia sobre los niveles a lo largo de toda la vida. Por esto el hallazgo de niveles de Coenzima Q10 aumentados en la leche de las madres que suplementaron su

## VI. DISCUSIÓN

dieta con cerveza sin alcohol, es un hallazgo interesante y novedoso de nuestro estudio.

### 10. SOBRE EL DAÑO OXIDATIVO NEONATAL

Para constatar si los cambios observados en la leche tenían alguna consecuencia sobre el metabolismo REDOX neonatal, medimos en la orina de los lactantes, el CGC, como proxy de daño oxidativo a proteínas, el MDA como proxy de daño a lípidos y la 8OHdG como proxy de daño a ADN (Schmidt, 1996; Winterbourn, 2000; Shoji, 2004).

La determinación de los niveles de grupos carbonilo está reconocido como un buen marcador de daño oxidativo a proteínas, y niveles elevados han sido correlacionados con un aumento de riesgo de cáncer de mama (Zippri, 2009).

Los niveles medidos en la orina de nuestros lactantes, fueron similares inicialmente en ambos grupos de neonatos (no hubo diferencias significativas intergrupos) pero no hemos encontrado estudios en la literatura sobre este marcador para el estrés oxidativo neonatal, por lo que no fue posible comparar resultados con otros autores. Sin embargo sí podemos decir que observamos signos indicativos de reparación del daño del día 2 al día 30, en ambos grupos de neonatos, que mostraron niveles inferiores en la orina del día 30. La disminución ya se presentó en los primeros 15 días aunque la disminución sólo fue significativa para el grupo de intervención. Y tan sólo en este grupo, se observaron niveles significativamente más bajos al comparar CGC en la orina de los primeros días frente al día 30.

El CGC como marcador de daño oxidativo en plasma es una técnica bien conocida y utilizada y se ha observado que los recién nacidos con bajo peso o los grandes para la edad gestacional tienen niveles más elevados que los recién nacidos con peso adecuado para la edad gestacional (Saker, 2008). Además se ha descrito que los recién nacidos pretérmino tienen niveles más elevados en plasma (Friel, 2011).

## VI. DISCUSIÓN

Dado que nuestro estudio se realizó en recién nacidos sanos a término, decidimos medir este marcador en orina para evitar métodos más cruentos. No hemos encontrado otros estudios al respecto en la literatura, sin embargo la homogeneidad de los resultados y la disminución de los niveles a lo largo del primer mes hace pensar que este podría ser un buen marcador de daño oxidativo para estudios en neonatos.

Los niveles de MDA en orina neonatal son considerados como buenos indicadores de daño oxidativo en neonatos pretérmino. Algunos autores (Schlenzing, 1993) observan niveles más elevados en los prematuros de muy bajo peso al nacimiento ( $1,16 \pm 0,9$  nmol/mL) o que requirieron oxigenoterapia o ventilación asistida. Otros (Korchazhkina, 2007) describen niveles inferiores ( $0,98 \pm 0,56$  nM/mL) en recién nacidos pretérmino sin requerimientos adicionales de oxígeno. Los niveles detectados en nuestros neonatos fueron inferiores debido probablemente a que se trataba de recién nacidos a término y sin enfermedad. A pesar de ello, los niveles iniciales de MDA (que no fueron significativamente diferentes entre grupos en las muestras tomadas al inicio del estudio) disminuyeron a lo largo del primer mes. De ello puede inferirse que se produjo una eficiente reparación del daño inicial en los neonatos de ambos grupos, que se traduce en niveles significativamente menores del día 2 al día 30. La reparación del daño fue especialmente evidente en los primeros 15 días, pero el nivel de reparación continuó, con una disminución significativa, del día 15 al día 30, sólo en el grupo de intervención, aunque la disminución inicial fue suficiente en ambos grupos para determinar niveles significativamente inferiores en ambos a los 30 días.

Se observó por tanto, una mayor disminución del daño en el grupo de intervención (en el que las madres habían mostrado mejor capacidad antioxidante en su leche y mayor contenido en CoQ10). No hemos encontrado publicaciones como la nuestra referidos a neonatos sanos, pero los resultados parecen indicar que este marcador podría ser utilizado como un indicador adecuado para evaluar el daño oxidativo, también en este grupo, es decir en recién nacidos sanos.

## VI. DISCUSIÓN

La excreción de 8-OH-dG en orina, es un indicador sensible, y muy utilizado por ello, para la medición del daño oxidativo sufrido por el ADN en los recién nacidos pretérmino. Y según algunos autores, este marcador es también adecuado como 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 (Shoji, 2011). Para otros autores, se trata de un indicador que mide sólo parcialmente el daño oxidativo infringido al ADN (Ledo, 2006). La medición de los niveles de 8OH-dG en los lactantes de nuestro estudio mostró niveles no significativamente diferentes entre los grupos. Con ello comprobamos que no había diferencias de partida en la situación oxidativa de los recién nacidos de ambos grupos. Sin embargo estos niveles iniciales fueron inferiores a los descritos por otros autores. Aunque otros grupos han publicado resultados diversos hay pocos que hayan estudiado este marcador en recién nacidos a término.

En los dos grupos de lactantes que estudiamos, observamos una disminución de los niveles de 8-OH-dG a lo largo del primer mes. En el grupo de intervención, esta disminución ya resultó significativa el día 15, pero no en el grupo control. En estudios realizados en recién nacidos sanos (Shoji 2003) y en recién nacidos pretérmino (Shoji, 2004, Friel, 2002, Ledo, 2006) varios autores muestran que el daño oxidativo medido por este indicador es mejor reparado cuando los recién nacidos son alimentados con leche materna (Friel, 2002). En nuestro estudio todos los recién nacidos estaban siendo amamantados, por lo que las diferencias observadas entre los grupos podrían ser atribuidos al mayor aporte de antioxidantes detectado en la leche de las mujeres que habían suplementado su dieta.

En nuestro grupo teníamos lactantes a término y sanos, que no habían precisado ni siquiera reanimación neonatal, y cuyas madres eran sanas y todos ellos amamantados. Por esto era de esperar que el daño oxidativo del ADN no fuera elevado y también que aún aumentando la capacidad antioxidante total de la leche materna en el grupo de mujeres suplementado, fuera difícil observar diferencias entre grupos. Es posible que un estudio sobre un mayor número de

## VI. DISCUSIÓN

lactantes y un seguimiento durante un periodo más largo, pudiera detectar mayores diferencias.

Por otra parte, aunque nuestros resultados demuestran sin duda una mejora en las características antioxidantes de la leche materna, los resultados obtenidos en la orina de los lactantes son mucho más limitados. Otros autores han realizado sus estudios en plasma neonatal de neonatos ingresados pretérmino o con bajo peso y muchos de ellos enfermos. Aunque sería interesante poder realizar un estudio del cambio oxidativo en plasma en lactantes amamantados sanos en relación al estatus nutricional y oxidativo materno, quizá sea necesario esperar a la innovación técnica que permita realizarlas en micro-muestra, o con técnicas transcutáneas que permitan evitar el empleo de técnicas cruentas.

### A MODO DE RESUMEN

Observamos que la capacidad antioxidante total y el contenido en antioxidantes (polifenoles y CoQ10) de la leche materna disminuyeron a lo largo de la lactancia junto a la mejora de los niveles iniciales de los marcadores de daño oxidativo (CGC, MDA, 8OHdG) medidos en la orina neonatal. Estos hechos, similares a los descritos por otros, indican la presencia de estrés oxidativo durante y tras el parto (Shoji 2004, Buonocore, 2002, Ezaki, 2007; Erdem, 2012) y la posible adaptación de la composición de la leche (en este caso en sus propiedades antioxidantes) a las necesidades decrecientes del neonato. Es posible, por tanto, que el contenido antioxidante en calostro sea mayor por estar destinado a responder a la necesidad del recién nacido, en el periodo de máxima vulnerabilidad y de máximo estrés oxidativo.

Pero nuestros resultados muestran que la suplementación dietética con cerveza sin alcohol mejoró la capacidad y el contenido antioxidante de la leche de las madres y que esto se tradujo en una mejor reparación del daño oxidativo neonatal. Esto, contravendría la explicación anterior y podría indicar que los niveles decrecientes de antioxidantes en la leche materna, pudieran ser consecuencia de

## VI. DISCUSIÓN

la disminución de las reservas maternas, cuyo organismo también debe hacer frente a importantes daños oxidativos tras el parto (Agarwal, 2012). En nuestro estudio, la adición de una bebida rica en antioxidantes mantuvo mejor la riqueza antioxidante de la leche y contribuyó a mejorar la reparación de los daños oxidativos en el neonato amamantado. Estos resultados, parecen indicar que es posible mantener la capacidad antioxidante en la leche materna más allá de los primeros días, suplementando la dieta con una bebida rica en sustancias antioxidantes. Lo que apuntaría a que quizá la disminución de la capacidad antioxidante de la leche humana no sea sólo debida a una adaptación a las necesidades del recién nacido.

La mayoría de los estudios, en este campo se han realizado con recién nacidos pretérmino. Nuestro estudio, realizado con recién nacidos a término, sanos, aporta más evidencia al hecho de que la leche materna, especialmente el calostro, es capaz de ayudar al neonato a paliar los efectos del estrés oxidativo derivado del nacimiento. Y, esto es importante, no sólo para los recién nacidos pretérmino para los que se ha descrito la relación del daño oxidativo con enfermedades neonatales graves. De acuerdo con los estudios, existe una correlación inversa entre la alimentación con lactancia materna y algunas enfermedades degenerativas en la vida adulta como la Diabetes Mellitus, el cáncer o las enfermedades cardiovasculares y todas ellas están relacionadas con el daño oxidativo. Y, quizá en parte, esto esté relacionado con la reparación del daño neonatal gracias al aporte de antioxidación de la leche materna, muy superior al de los sucedáneos. Es posible por tanto que asegurar una dieta equilibrada y rica en antioxidantes, contribuya a mejorar el contenido y propiedades antioxidantes de la leche humana y la salud del lactante y del futuro adulto.

## V. DISCUSION



## VII. CONCLUSIONES:

## V. DISCUSSION

## V. DISCUSION

### CONCLUSIONES:

1. Las mujeres de nuestro estudio mostraron dietas desequilibradas y poco sanas con:
  - a. bajo consumo de hidratos de carbono,
  - b. elevado consumo de grasas con exceso de ácidos grasos saturados y mononinsaturados y deficitario en poliinsaturados,
  - c. bajo consumo de ácido fólico, vitamina E, vitamina A, cobre y cinc,
  - d. y un consumo excesivo de sodio.
2. La capacidad antioxidante detectada en las mujeres de nuestro estudio fue superior a la descrita en grupos de mujeres portuguesas o polacas y más parecidas a la de las mujeres italianas.
3. La capacidad antioxidante de la leche humana, disminuye a lo largo del primer mes postparto, en las madres sanas con recién nacidos a término, si no se realiza ninguna intervención.
4. La leche materna contiene cantidades no despreciables de polifenoles y coenzima Q10, que muy probablemente estén en relación con la dieta materna.
5. El contenido en CoQ10 disminuye en los primeros 15 días postparto pero se recupera posteriormente.
6. El contenido en polifenoles disminuye a lo largo del primer mes postparto.
7. La suplementación de la dieta materna con una bebida rica en antioxidantes como la cerveza sin alcohol, durante el primer mes postparto, modifica positivamente el estatus oxidativo de la leche humana
8. La suplementación de la dieta materna con una bebida rica en antioxidantes mejora su contenido en coenzima Q10.

## VII. CONCLUSIONES

9. El estatus oxidativo de los RN a término amamantados mejora cuando la calidad oxidativa de la leche materna mejora.

## CONCLUSIÓN FINAL

Como resultado de este trabajo concluimos que la suplementación con cerveza sin alcohol aumenta la actividad y el contenido antioxidante de la leche materna durante el primer mes postparto y contribuye a mejorar los daños producidos por el estrés oxidativo en el recién nacido.

## VIII. BIBLIOGRAFIA



## VIII. BIBLIOGRAFÍA

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

## VII. BIBLIOGRAFÍA

Aboul-Enein HY, Kruk I, Kladna A, Lichszfeld K, Michalska t. Scavenging effects of phenolic compounds on reactive oxygen species. *Biopolymers*, 2007; 86: 222-230.

Abrahamse E, Minekus M, van Aken GA, van de Heijning B, Knol J, Bartke N, Oozeer R, van der Beek EM, Ludwig T. Development of the Digestive System-Experimental Challenges and Approaches of Infant Lipid Digestion. *Food Dig*, 2012; 3: 36-77.

Abudu N, Miller JJ, Attaelmannan M, Levinson SS. Vitamins in human arteriosclerosis with emphasis on vitamin C and vitamin E. *Clin Chim Acta*, 2004; 339: 11-25.

Aherne, S. A., O'Brien, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 2002; 18: 75-81.

Ahmad S, Khan MS, Akhter F, Khan MS, Khan A, Ashraf JM, Pandey RP, Shahab U. Glycooxidation of biological macromolecules: A critical approach to halt the menace of glycation. *Glycobiology*, 2014;24:979-990.

Alberti-Fidanza A, Burini G, Perriello G. Total antioxidant capacity of colostrums, and transitional and mature human milk. *J Mat Fetal Neonatal Med*, 2002; 11: 275-279.

Alfadda AA, Sallam RM. Reactive Oxygen Species in Health and Disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012; 2012: 936486. doi :10.1155/2012/936486. Epub 2012, Aug 8.

Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol*, 2010; 42: 1634-1650.

Allen RG, Trensini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, 2000; 28: 463-99.

Alsaweed M, Hepworth AR, Lefevre C, Hartmann PE, Geddes DT, Hassiotou F. Human milk microRNA and Total RNA Differ Depending on Milk Fractionation. *J Cell Biochem*, 2015; Apr. 28. doi: 10.1002/jcb.25207 (Epub ahead of print).

Ameen M, Ahamad I, Musthapa MS, Rahman Q. Cytotoxic effect and role of

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

exogenous antioxidants in carpet dust mediated toxicity in rat hepatocytes in vitro. *Toxicol In Vitro*, 2004; 18: 419-425.

Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993; 90: 7915-7922.

Andriantsitohaina R, Auger C, Chataigneau T, Etienne-Selloum N, Li H, Martínez MC, et al. Molecular mechanisms of the cardiovascular protective effects of polyphenols. *Br J Nutr*, 2012; 108: 1532-1549.

Arab L, Wesseling-Perry K, Jardack P, Henry J, Winter A. Eight Self-Administered 24-hour dietary Recalls Using the Internet are Feasible in African Americans and Caucasians: The energetics Study. *J Am Diet Assoc*, 2010; 110: 857-864.

Argawal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ, Shaman A, Gupta S. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2012; 10: 49.

Arnaud J, Fortis I, Blachier S, Kia , Favier A. Simultaneous determination of retinal, alfa-tocopherol and beta-carotene in serum by isocratic high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*, 1991; 572: 103-116.

Arnold, John P. *Origin and History of Beer and Brewing: From Prehistoric Times to the Beginning of Brewing Science and Technology.:* Reprint Edition by BeerBooks. Cleveland, Ohio, 2005. p. 411. ISBN 0-9662084-1-2.

Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: the devil is in the details. *Pediatr Res*, 2009; 66: 121-127.

Aycicek A, Erel O, Kocyigit A, et al. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition*, 2006; 22: 616-619.

Aydemir C, Dilli D, Uras N, Ulu HO, Oguz SS, Erdeve O, Dilmen U. Total oxidant status and oxidative stress are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg*, 2011; 46: 2096-2100.

Azeredo VB, Trugo NMF. Retinol, carotenoids, adntocopherols in the milk of lactating adolescents and relationships with plasma concentrations. *Nutrition*, 2008; 24: 133-139.

Bachour P, Yafawi R, Jaber F, et al. Effects of smoking, mother's age, body mass index, and parity number on lipid, protein, and secretory immunoglobulin A concentrations

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

of human milk. *Breastfeed Med*, 2012; 7: 179–186.

Ballabriga A. Estilo de vida, medioambiente y enfermedades en la infancia. *An Esp Pediatr*, 1990; 33 (Suppl 42): 1-19.

Ballard O, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*, 2013; 60: 49-74.

Bamforth CW. Chapter 3. The Basics of Malting and Brewing: Product Safety and Wholesomeness. In: Bamforth CW. ed. *Beer in Health and Nutrition*. Blackwell Science Ltd, Oxford, UK 2004. p: 50-51. ISBN 0-632-06446-3.

Barton JP, Parker JE. The radiolysis of oxygenated cysteine solutions at neutral pH. The role of RSSR and O<sub>2</sub><sup>-</sup>. *Int J Radiat Phys Chem*, 1970; 2: 159-166.

Baydas G, Karatas F, Gursu MF, Bozkurt HA, Ilhan N, Yasar A, Canatan H. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res*, 2002; 33: 276-280.

Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol*, 1996; 271: C1424-C1437.

Beecher GR. Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. *J Nutr*, 2003; 133: 3248-3254S.

Bentinger M, Brismar K, Dallner G. The antioxidant role of coenzyme Q. *Mitochondrion*, 2007; 7(Suppl): S41–S50.

Bentinger M, Turunen M, Zhang XX, Wan YJ, Dallner G. Involvement of retinoid X receptor alpha in coenzyme Q metabolism. *J Mol Biol*, 2003; 326: 795–803.

Benzie IF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: The FRAP assay. *Anal Biochem*, 1996; 239: 70-76.

Berti C, Cetin L, Agostoni C, Desoye G, Devlieger R, Emmett PM, Ensenaer R, Hauner H, Herrera E, Hoesli I, Krauss-Etschmann S, Olsen SF, Schaefer-Graf U, Schiessl B, Symonds ME, Koletzko B. Pregnancy and infants' outcome: nutritional and metabolic implications. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2014 Mar 14 (epub ahead of print).

Betteridge DJ. What is oxidative stress? *Metabolism*, 2000; 49 (2 suppl 1): 3-8.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Black J, Cunningham G, Robson E. The literature of ancient Sumer. Oxford University Press. Oxford: 2004. ISBN 0-19-926311-6.

Black RE, Allen LH, Bhutta ZA, Caulfield LE, de Onis M, Ezzati M. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. *Lancet*, 2008; 371: 243-260.

Block G, Norkus E, Hudes M, Mandel S, Helzlsouer K. Which plasma antioxidants are most related to fruit and vegetable consumption? *Am J Epidemiol*, 2001; 154: 1113-1118.

Borowczyk E, Caton JS, Redmer DA, Bilski JJ, Weigl RM, Vonnahme KA, Borowicz PP, Kirsch JD, Kraft KC, Reynolds LP, Grazul-Bilska AT. Effects of plane of nutrition on in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. *J Anim Sci*, 2006; 84:1593-1599.

Bourne L, Paganga G, Baxter D, Hughes P & Rice-Evans C. Absorption of ferulic acid from low alcohol beer. *Free Rad Res*, 2000; 32: 273-280.

Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial generation of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett*, 1975; 54: 311-314.

Bowen PE, Mobarhan S, Smith JC Jr. Carotenoid absorption in humans. *Methods Enzymol*, 1993; 214: 3-17.

Brandt K, Christensen LP, Hansen-Moller J, Hansen SL, Haraldsdottir J, Jespersen L, et al. Health promoting compounds in vegetables and fruits: a systematic approach for identifying plant components with impact on human health. *Trends Food Sci Tech*, 2004; 15: 384-393.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT Food Sci Technol*, 1995; 28: 25-30.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rev*, 1998; 56: 317-333.

Breen AP, Murphy JA. Reactions of oxyl radicals with DNA. *Free Radic Biol Med*, 1995; 18: 1033-1077.

Brigelius-Flohé R, Traber MG. Vitamin E: function and metabolism. *FASEB J*, 1999; 13: 1145-1455.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Buescher ES, McIlheran SM. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res*, 1988; 24: 14-19.

Buonocuore G, Perrone S, Longini M, vezzosi P, Marzocchi B, Paffetti P, Bracco R. Oxidative Stress in Preterm Neonates at birth and on the Seventh Day of Life. *Pediatric Research*, 2002; 52: 46-49.

Burns J, Fraser PD, Bramley PM. Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. *Phytochem*, 2003; 62: 939-947.

Burton, G. J. and Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Practice and Research Clinical Obstetrics and Gynaecology*, 2011; 25: 287-299.

Butte NF; Wong WE, Treuth MS, Ellis KJ, O'Brian Smith E. Energy requirements during pregnancy based on total energy expenditure and energy deposition. *Am J Clin Nutr*, 2004; 79: 1078-87.

Cadenas E, Davies KJ. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 2000; 29: 222-30.

Cadenas E. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem*, 1989; 58: 79-110.

Calleja Colorado J. A. Memorias. Historia de la Cerveza en España. En: Proyecto de fin de carrera de Ingeniería Química. Diseño de una planta de elaboración de cerveza artesanal para consumo directo. Micro cervecería. Facultad de Ciencias. Escuela de Ingeniería Química. Universidad de Cádiz. Cádiz, 2013.

Campbell K . Intensive oxygen therapy as a possible cause of retrolental fibroplasia; a clinical approach. *Med J Aust*, 1951; 2: 48-50.

Canfield LM, Clandinin MT, Davies DP, Fernandez MC, Jackson J, Hawkes J, et al. Multinational study of major breast milk carotenoids of healthy mothers. *Eur J Nutr*, 2003; 42: 133-141.

Cassano A, Drioli E, Galaverna G, Marchelli R, Di Silvestro G, Cagnasso P. Clarification and concentration of citrus and carrot juices by integrated membrane processes. *J Food Eng*, 2003; 57: 153-163.

Cassidy A, Hansley B, Lamuela-Raventos R M. Isoflavones, lignans and stilbenes-

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric*, 2000; 80: 1044-1062.

Cervato G, Cazzola R, Cestaro B. Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int J Food Sci Nutr*, 1999; 50: 291-206.

Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev*, 1979; 59: 527-605.

Cheal SM, Ng M, Barrios B, Miao Z, Kalani AK, Meares CF. Mapping protein-protein interactions by localized oxidation: consequences of the reach of hydroxyl radical. *Biochemistry*, 2009; 48: 4577-4586.

Cheyrier, V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81(1 Suppl): 223S-229S.

Cho SH, Lee CH, Ahn Y, Kim H, Kim H, Ahn CY, Yang KS, Lee SR. Redox regulation of PTEN and protein tyrosine phosphatases in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediated cell signaling. *FEBS Lett*, 2004; 560, 7-13.

Clifford MN. Anthocyanidins-nature, occurrence and dietary burden. *J Sci Food Agric*, 2000; 80: 1063-1072.

Codoñer-Franch P, Betoret E, Betore N, López-Jaén A, Valls-Bellés V, Fito P. Dried apples enriched with mandarin juice by vacuum impregnation improve antioxidant capacity and decrease inflammation in obese children. *Nutr Hosp*, 2013; 28: 1177-1183.

Codoñer-Franch P, Bataller A, Domingo JV, Escribano M, Valls V. Influence of dietary lipids on the erythrocyte antioxidant status of hypercholesterolaemic children. *European J Pediatr*, 2008; 168: 321-327.

Codoñer-Franch P, Boix-García L, Simó-Jordá R, Del Castillo-Villaescusa C, Maset-Maldonado J, Valls-Bellés V. Is obesity associated with oxidative stress in children? *International Journal of Pediatric Obesity*, 2010; 5: 56-63.

Codoñer-Franch P, Muñoz P, Gasco E, Domingo JV, Valls-Bellés V. Effect of a Diet Supplemented with  $\alpha$ -Tocopherol and  $\beta$ -Carotene on ATP and Antioxidant Levels after hepatic Ischemia-Reperfusion. *J Clin Biochem Nutr*, 2008; 43: 13-18.

Codoñer-Franch P, Navarro-Ruiz A, Fernández-Ferri M, Arilla-Codoñer A, Ballester-

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Asensio E, Valls-Bellés V. A matter of fact: insulin resistance and oxidative stress. *Pediatr Diabetes*, 2012; 13: 392-399.

Codoñer-Franch P, Tavárez-Alonso S, Murria-Estal R, Herrera-Martín G, Alonso-Iglesias E. Polyamines are increased in obese children and are related to markers of oxidative/nitrosative stress and angiogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2011; 96: 2821-2825.

Codoñer-Franch P, Valls-Bellés V, Arilla-Codoñer A, Alonso-Iglesias E. Oxidant mechanisms in childhood obesity: the link between inflammation and oxidative stress. *Translational Research*, 2011; 158: 369-384.

Commoner B, Temberg JL. Free radicals in surviving tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1961; 47: 1374-1384.

Consellería de Sanitat. D. G. de Salud Pública. Servicio de Salud Infantil. Programa de Supervisión de la Salud Infantil. Valencia, 1999, 2ªed, p 16-27. ISBN: 84-482-1633-4.

Correa Mendonça A. Atividade antioxidante de poliaminas e comparação com produtos naturais e sintéticos Faculdade de Farmácia da UFMG Belo Horizonte, MG; 2009. [http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MB\\_SA-7ZLKNA/disserta\\_o\\_adriana\\_2009.pdf?sequence=1](http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/MB_SA-7ZLKNA/disserta_o_adriana_2009.pdf?sequence=1) (en Portugués)

Culotta E, Koshland DE Jr. NO news is good news. *Science*, 1992; 258: 1862-1865.

Dandriofosse G, Peulen O, El KN, Deloyer P, Dandriofosse AC, Grandfils C. Are milk polyamines preventive agents against food allergy? *Proc Nutr Soc*, 2000; 59: 81-86.

Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine*, 2010; 15: 191-195.

Davis PG; Tan A, O'Donnell CP. Resuscitation of newborn infants with 100% oxygen or air: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*, 2004; 364: 1329-1333.

De Pee S, West CE. Dietary carotenoids and their role in combating vitamin A deficiency: a review of the literature. *Eur J Clin Nutr*, 1996; 50: S38-S53.

DeLemos R, Wolfsdorf J, Nachman R, Block AJ, Leiby G, Wilkinson HA, Allen T, Haller JA, Morgan W, Avery ME. Lung injury from oxygen in lambs: the role of artificial ventilation. *Anesthesiology*, 1969; 30: 609-618.

Delplanque B, Gibson R, Koletzko B, Lapillonne A, Strandvik B. Lipid Quality in Infant

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Nutrition: Current Knowledge and Future Opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015, Apr 15 (Epub ahead of print). Disponible en [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883056](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25883056) (ultimo acceso 28/04/2015).

Dittrich R, Hoffmann I, Stahl P, Müller A, Beckmann MW, Pischetsrieder M. Concentrations of N<sup>ε</sup>-Carboxymethyllysine in Human Breast Milk, Infant Formulas, and Urine of Infants. *J. Agric. Food Chem*, 2006; 54: 6924–6928.

Drehmer E, Valls V, Muñoz P, Cabo J, Sáez GT. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine levels and antioxidant status in rat liver fed with olive and corn oil diets: Effect of ascorbic acid supplementation. *J Food Lipids*, 2001; 8: 281-294.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 2002; 82: 47-95.

Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol*, 2012; 748: 145-169.

Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer. *Biochim Biophys Acta*, 2012; 1826: 443-57.

Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen / nitrogen species. *Glycobiology*, 2011; 21: 401-409.

EFSA 2010. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA J*, 2010; 8:1461.

Ellingsen I, Seljeflot I, Arnesen H, Tonstad S. Vitamin C consumption is associated with less progression in carotid intima media thickness in elderly men: A 3-year intervention study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2009; 19: 8-14.

Elmafda I, Meyer A, Nowak V, Hasenegger V, Putz P, Verstraeten R, Remaut-DeWinter AM, Kolsteren P, Dostálová J, Dlouhy P. European Nutrition and Health Report. *Ann Nutr Metab*, 2009;55:1-40.

Epplein M, Shu XO, Xiang YB, Chow WH, Yang G, Li HL, et al. Fruit and vegetable consumption and risk of distal gastric cancer in the Shanghai Women's and Men's Health studies. *Am J Epidemiol*, 2010; 172: 397-406.

Erdem M, Harna M, Harna IM, et al. Comparative study of oxidative stress in maternal

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

blood with that of cord blood and maternal milk. *Arch Gynecol Obstet*, 2012; 285: 371–375.

Erdman JW Jr, Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*, 1993; 691, 76-85.

Estruch R, Ros E, Salas-Salvado J, Covas MI, Corella D, Arós F, Gómez-Gracia E, Ruiz-Gutiérrez V, Fiol M, Lapetra J, Lamuela-Raventós RM, Serra-Majem L, Pintó X, Basora J, Muñoz MA, Sorlí JV, Martínez JA; Martínez-González MA. for the PREDIMED Study Investigators. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. *New Eng J Med*, 2013; 368: 1279-1290.

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.

FAO. Fats and Fatty Acids in Human Nutrition: Report of an Expert Consultation. FAO Food and Nutrition Paper, 2010; No. 91. FAO: Rome.

Favier J, Ireland-Ripert J, Toque C, Feinberg M. Repertoire general des aliments – Table de composition. 2<sup>a</sup> edition. INRA Editions, Paris, 1995. ISBN: 978-2-7380-0655-4.

Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD). Ingestas dietéticas de referencia (IDR) para la población española. Ed. EUNSA. Pamplona, 2010.

Fenton HJH. Oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Trans*, 1894; 65: 899-910.

Fernandez L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res*, 2013; 69: 1-10.

Fewtrell MS. Breast-feeding and later risk of CVD and obesity: Evidence from randomised trials. *PROC NUTR SOC*, 2011; 70: 472-477.

Finaud J, Lac G, Filaire E. Oxidative stress: relationship with exercise and training. *Sports Med*, 2006; 36: 327-358.

Franco MCP, Kawamoto EM, Gorjão R, Rastelli VMF, Curi R, Scavone C, Sawaya L, Fortes ZB, Sesso R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Status in Children Born

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Small for Gestational Age: Evidence of Lipid Peroxidation. *Pediatr Res*, 2007;62:204-208.

Franke AA, Halm BM, Custer LJ, Tatsumura Y, Hebshi S. Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy. *Am J Clin Nutr*, 2006;84:406-13.

Frei B, Stocker R, England L, Ames BN. Ascorbate: the most effective antioxidant in human blood plasma. *Adv Exp Med Biol*, 1990; 264: 155-163.

Frei B. Reactive oxygen species and antioxidant vitamins: mechanisms of action. *Am J Med*, 1994; 97: 5S-13S; discussion 22S-28S.

Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), Superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem*, 1997; 272: 18515-7.

Fridovich I. The biology of oxygen radicals. *Science*, 1978;201:875-880.

Friel JK, Diehl-Jones B, Cockell KA, Chiu A, Rabanni R, Davies SS et al. Evidence of oxidative stress in relation to feeding type during early life in premature infants. *Pediatr Res*, 2011; 69: 160-4.

Friel JK, Friesen RW, Harding SV, et al. Evidence of oxidative stress in full-term healthy infants. *Pediatr Res*, 2004;56:878-882.

Frigerio C, Schutz Y, Prentice A, Whitehead R, Jéquier E. Is Human Lactation a Particularly Efficient Process? *European Journal of Clinical Nutrition*, 1991; 45: 459-462.

García-Alonso FJ, Guidarelli A, Periago MJ. Pehnolic-rich juice prevents DNA single-strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide in U937 cells: The role of iron chelation. *J Nutr Biochem*, 2007; 18: 457-466.

García-Arenzana N, Navarrete-Muñoz EM, Vazquez-Carretero JA, Moreno MP, Vidal C, Salas D, Ederra M, Pedarza C, Collado-García F, Sánchez-Contador C, González-Román I, García-López M, Miranda J, Peris M, Moreo P, Santamariña C, Pérez-Gómez B, Vioque J, Pollán M; grupo DDM-Spain. *Nutr Hosp*, 2011; 26: 863-873.

Gardner PT, White TAC, McPhail DB, Duthie GG. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. *Food Chem*, 2000; 68: 471-474.

Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovacs A, Kovacs L, et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2002; 103: 136-139.

Gitto E, Pellegriono S, Gitto P, Barberi I, Reiter RJ. Oxidative stresses of the newborn in the pre- and postnatal period and the clinical utility of melatonin. *J Pineal Res*, 2009; 46: 128-139.

Gluckman PD, Hanson MA, Phil D, Cooper C, Thornburg KL. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N Engl J Med*, 2008; 359: 61-73.

González C. *Bésame mucho*. Editorial Temas de Hoy. Madrid, 2003. ISBN: 84-8460-262-1

González ML, Muñiz P, Valls V. *Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo*. Madrid: Centro de Información Cerveza y Salud, Madrid 2001.

Gopinathan V, Miller NJ, Milner AD, Rice-Evans CA. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in neonatal plasma. *FEBS Lett*, 1994; 349: 197-200.

Gossage CP, Deyhim M, Yamini S, Douglass LW, Moser-Veillon PB. Carotenoid composition of human milk during the first month postpartum and the response to beta-carotene supplementation. *Am J Clin Nutr*, 2002; 76: 193-197.

Grazioso CF, Buescher ES. Inhibition of neutrophil function by human milk. *Cell Immunol*, 1996; 168: 125-32.

Greenberg JA, Stacey JB, Guan Y, Yu Y. Folic Acid Supplementation and Pregnancy: More Than Just Neural Tube Defect Prevention. *Rev Obstet Gynecol*, 2011; 4: 52-59.

Grisham MB, Jourdain D, Wink DA. Nitric Oxide. I. Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *Am J Physiol*, 1999; 276(2 Pt 1): G315-21.

Gugliucci A, Menini T. The polyamines spermine and spermidine protect proteins from structural and functional damage by AGE precursors: a new role for old molecules? *Life Sci*, 2003; 72: 2603-2616.

Haastrop MB, Pottegård A, Damkier P. Alcohol and Breastfeeding. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2014; 114: 168-173.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 4th ed. Oxford Bioscience, 2007. ISBN 978-0-19-856869-8.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Halliwel B. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr*, 1996; 16: 33-50.
- Halliwel B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans*, 2007; 35: 1147-1150.
- Halliwel B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*, 2012; 70: 257-265.
- Hanson LA. Session 1: Feeding and infant development Breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc*, 2007; 66: 384-396.
- Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 7124-7128.
- Haskell MJ, Brown KH. Maternal vitamin A nutriture and the vitamin A content of human milk. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1999; 4: 243-57.
- Hassiotou F, Hartmann PE. At the dawn of a new discovery: the potential of breast milk stem cells. *Adv Nutr*, 2014; 14: 770-778.
- Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*, 2002; 13: 572-584.
- Hernández-Aguilar MT, Lozano de la Torre MJ, Borja-Herrero C, Lasarte-Velillas JJ, Martorell-Juan L. Antioxidant properties of breast milk. *J Ped Biochem*, 2013; 3: 161-167.
- Herrera E, Jiménez R, Aruoma OI, Hercberg S, Sánchez-García I, Fraga C. Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutr Rev*, 2009; 67(Suppl 1): S140-4.
- Holliday R. Epigenetics comes of age in the twenty first century. *Journal of Genetics*, 2002; 81: 1-4.
- Homan, Michael M. "Beer and Its Drinkers: An Ancient Near Eastern Love Story." *Near Eastern Archaeology*, 2004; 67: 84-9.
- Hoppu U, Rinne M, Salo-Vaananen P, Lampi AM, Piironen V, Isolauri E. Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *Eur J Clin Nutr*, 2005; 59 :123-8.
- Hornsey IS. Notes from the Hymn to Ninkasi. En: *A History of Beer and Brewing*. Ed. Royal Society of Chemistry. 1993. RSC Paperbacks, Cambridge. p86.
- Horta BL, Victora CG. Long-term effects of breastfeeding. A systematic review. *World*

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Health organization, 2013, Geneva.

Hubbard GP, Wolfram S, Lovegrove JA, Gibbins JM. The role of polyphenolic compounds in the diet as inhibitors of platelet function. *Proc Nutr Soc*, 2003; 62: 469-78.

Hunnicutt J, He Ka, Xun Pengcheng . Dietary Iron Intake and Body Iron Stores Are Associated with Risk of Coronary Heart Disease in a Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *J Nutr*, 2014; 144: 359-366.

Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Ann Pharmacol Toxicol*, 1985; 25: 171-191

Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. Washington, DC: National Academy Press; 2000.

Ip S, Chung M, Raman G, Chew P, Magula N, DeVine D. Breastfeeding and Maternal and Infant Health outcomes in Developed countries. Evidence report Technology Assessment. Number 153. Publicacion N° 07-E007. Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ), 2007.

Irmak MK, Oztas Y, Oztas E. Integration of maternal genome into the neonate genome through breast milk mRNA transcripts and reverse transcriptase. *Theor Biol Med Model*, 2012; 9: 20

Isa F, Xie LP, Hu Z, Zhong Z, Hemelt M, Reulen RC, et al. Dietary consumption and diet diversity and risk of developing bladder cancer: results from the South and East China case-control study. *Cancer Causes Control*, 2013; 24: 885-895.

Jackson MJ, Papa S, Bolaños J, Bruckdorfer R, Carlsen H, Elliott RM, et al. Antioxidants, reactive oxygen and nitrogen species, gene induction and mitochondrial function. *Mol Aspects Med*, 2002; 23: 209-285.

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.

Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. *J Biosci*, 2012; 37: 503-517.

Jing L, He MT, Chang Y, Mehta SL, He QP, Zhang JZ, Li PA. Coenzyme Q10 protects astrocytes from ROS-induced damage through inhibition of mitochondria-mediated

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

cell death pathway. *Int J Biol Sci*, 2015;11:59-66.

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.

John JH, Ziebland S, Yudkin P, Roe LS, Neil HA, et al. Effects of fruit and vegetable consumption on plasma antioxidant concentrations and blood pressure: a randomised controlled trial. *Lancet*, 2002; 359: 1969-1974.

Kamelska AM, Pietrzak-Fiecko R, Bryl K. Variation of the cholesterol content in breast milk during 10 days collection at early stages of lactation. *Acta Biochim Pol*, 2012; 59: 243-247.

Karamenderes C, Konyalioglu S, Khan S, Khan IA. Total phenolic contents, free radical scavenging activity and inhibitory effects on the activation of NF-kappa B of eight cenaturea L. species. *Phytother Res*, 2007; 21: 488-491.

Kaur H, Halliwell B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett*, 1994; 350: 9-12.

Khachick F, Spangler CJ, Smith JC Jr, Canfield LM, Steck A, Pfander H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem*, 1997; 69: 1873-1881.

Khan S, Casadio YS, Lai CT, Prime DK, Hepworth AR, Trengove NJ, Hartmann PE. Investigation of short variations in casein and whey proteins in breast milk of term mothers. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2012; 55: 136 -141.

Kivatinitz SC. Relationship between protein oxidation markers and oxidative stress biomarkers. In: *Inflammatory Diseases-Immunopathology, Clinical and Pharmacological Bases*. Khatami M. Ed. In Tech pub. Rijeka, 2012. pp 270-289. ISBN: 978-953-307-911-0

Knight J. Free radicals: their history and current status in ageing and disease. *Ann Clin Lab Sci*, 1998; 28: 331-346.

Koletzko B, Lehner F. Beer and breastfeeding. *Adv Exp Med Biol*, 2000; 478: 23-28.

Koleva PT, Bridgman SL, Kozyrskj AL. The infant Gut Microbiome: Evidence for Obesity

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Risk and Dietary Intervention. *Nutrients*, 2015; 31: 2237-2260

Kontush A, Finckh B, Karten B, Kohlschütter A, Beisiegel U. Antioxidant and prooxidant activity of alpha-tocopherol in human plasma and low density lipoprotein. *J Lipid Res*, 1996; 37: 1436-48

Korycka-Dahl M, Richardson T. Initiation of oxidative changes in food. *J Dairy Sci*, 1980; 63: 1181-98.

Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, Georgakylas AG. Review. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research*, 2011; 711: 193-201.

L'Abbe MR, Friel JK. Copper status of very low birth weight infants during the first 12 months of infancy. *Pediatr Res*, 1992; 32:183-188.

L'Abbe MR, Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2000; 31: 270-174.

Lakenbrink C, Lapczynski S, Maiwald B, Engelhardt UH. Flavonoids and other polyphenols in consumer brews of tea and other caffeinated beverages. *J Agric Food Chem*, 2000; 48: 2848-2852.

Larque E, Sabater-Molina M, Zamora S. Biological significance of dietary polyamines. *Nutrition*, 2007; 23: 87-95.

Lasarte-Velillas JJ, Hernández-Aguilar MT, Martínez-Boyero T, Soria-Cabeza G, Soria-Ruiz D, Bastarós-García JC, Gil-Hernández I, Pastor-Arilla C, Lasarte-Sanz I. Estimación de la prevalencia de sobrepeso y obesidad infantil en un sector sanitario de Zaragoza utilizando diferentes estándares de crecimiento. *Anal Ped*, 2015; 82 :152-158.

Lawrence R, Pane C. Human Breast Milk: Current concepts of Immunology and Infectious Diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, 2007; 37: 7-36.

Lawrence R. 4. Biochemistry of human milk. In *Breastfeeding: a guide for the medical profession*. Lawrence RA and Lawrence RM eds. 6th edition. Mosby, Philadelphia, 2005, pp:105-170.

Lawrence RA, Lawrence RM. Biochemistry of human milk. In: Elsevier Health Sciences, editor. *Breastfeeding. A guide for the Medical Profession* (7th ed). Elsevier/Mosby ed.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Maryland Heights, Missouri, 2010. p. 105-111.

Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M, Aguar M, Saenz P, Vento M. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr*, 2009; 89: 210–215.

Lee WL, Davis JM. Future Applications of Antioxidants in Premature Infants. *Curr Opin Pediatr*, 2011; 23: 161-166.

Leo MA, Ahmed S, Aleynik SI, Siegel JH, Kasmin F, Lieber CS. Carotenoids and tocopherols in various hepatobiliary conditions. *J Hepatol*, 1995; 23: 550-556.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadtman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol*, 1990; 186: 464-479.

Li H, Poulos TL. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J Inorg Biochem*, 2005; 99: 293-305.

Li W, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*, 2009; 25: 105–114.

Lindmark-Mansson H, Akesson B. Antioxidative factors in milk. *Br J Nutr*, 2000; 84 Suppl 1: S103-S110.

Litarru GP, Tiano L. Bioenergetic and antioxidant properties of coenzyme Q10: recent developments. *Mol Biotechnol*, 2007; 37: 31-37.

Liu H, Zhao H, Li B, Kalyanaraman A, Nicolosi C, Gutterman DD. "Mitochondrial sources of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation play a key role in flow-mediated dilation in human coronary resistance arteries," *Circulation Research*, 2003; 93: 573–580.

Liu H, Zheng F, Cao Q, Ren B, Zhu L, Striker G, et al. Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2006; 290: E824-E832.

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.

Lobo V, Patil A, Phatak A, Chandra A. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*, 2010; 4: 118-126.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Lonnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr*, 2010; 156 (2 suppl): S26-S30.
- Lonnerdal B. Nutritional and Physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr*, 2003; 77(suppl): 1537S–1543S.
- Macheix JJ, Fleuriet A, Billot J. Fruit phenolics. Boca Raton, Florida; CRC Press. 1990. ISBN:0-8493-4968-0.
- Macias C, Schweigert FJ. Changes in the concentration of carotenoids, vitamin A, alpha-tocopherol and total lipids in human milk throughout early lactation. *Ann Nutr Metab*, 2001; 45: 82-85.
- Malireddy S, Kotha SR, Jordan Sd, Gurney T, Abbott JL, Maulik G, maddipati KR; Parinandi NL. Antioxidants & Redox Signaling, 2012; 17: 327-33.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nut*, 2004; 79: 727-47.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81 (1 Suppl): 230S-242S.
- Mancuso C, Scapagnini G, Curró D, Stella AMG, De Marco C, Butterfield DA, Calabrese V. Mitochondrial dysfunction, free radical generation and cellular stress response in neurodegenerative disorders. *Frontiers in Bioscience*, 2007; 12 : 1107-1123.
- Martínez JR, Valls Bellés V, López-Jaén AB, Marín AV, Codoñer-Franch P. Effects of alcohol-free beer on lipid profile and parameters of oxidative stress and inflammation in elderly women. *Nutrition*, 2009; 25: 182–187.
- Martinez JR, Valls V, Villarino Marín A. El lúpulo contenido en la cerveza, su efecto antioxidante en un grupo controlado de población. SEDCA. Centro de Información Cerveza y Salud. Madrid, 2007.
- Martínez JR, Villarino AL, Cobo JM. Cerveza sin alcohol, sus propiedades. Madrid, 2001. Centro de información cerveza y salud.
- Martínez-Flórez S, Gonzalez-Gallego J, Culebras J M, Tuñon MJ. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 2002; 17: 271-278

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Martysiak-Zurowska D, Wentka 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.

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: 577-86.

Mataix J, García L, Mañas M, Martínez de Vitoria E, Llopis J. *Tablas de composición de alimentos*. Ed. Universidad de Granada, 2009.

Mataix J. *Nutrición y alimentación humana. Situaciones fisiológicas y patológicas*. Vol II. 1ª edición. Ed. Ergón. Madrid, 2002. ISBN: 84-8473-088-3.

Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005; 827: 76-82.

Matos C, Moutinho C, Balçao V, Almeida C, Ribeiro M, Franklim-Marques A, Guerra A. Total antioxidant activity and trace elements in human milk: the first 4 months of breast-feeding. *Eur Food Res Technol*, 2009; 230: 201-208.

McCall MR, Frei B. Can antioxidant vitamins materially reduce oxidative damage in humans? *Free Radic Biol Med*, 1999; 26: 1034-1053.

McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*, 1969; 244: 6049 – 6055.

McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med*, 2000; 108: 652-659.

Mello-Neto J, Rondó PH, Morgano MA, Oshiiwa M, Santos ML, Oliveira JM. Iron concentrations in breast milk and selected maternal factors of human milk bank donors. *J Hum Lact*, 2010; 26: 175-179.

Mello-Neto J, Rondo PH, Oshiiwa M, Morgano MA, Zacari CZ, Domingues S. The influence of maternal factors on the concentration of vitamin A in mature breast milk. *Clin Nutr*, 2009; 28: 178–181.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Meneses F, Trugo NMF. Retinol, b-carotene, and lutein + zeaxanthin in the milk of Brazilian nursing women: Associations with plasma concentrations and influences of maternal characteristics. *Nutr Res*, 2005; 25: 443–451.

Mennella JA, Beauchamp GK. Beer, breast feeding, and folklore. *Dev . Psychobiol*, 1993; 26: 459-466.

Michalski MC. Lipids and milk fat globule properties in human milk. In Zibadi sm Watson RR, Preedy VR, eds. *Handbook of dietary and nutritional aspects of human breast milk*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, 2013. pp 315-334.

Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. *Pharmacol Rev*, 2000; 52: 673-751.

Miles AM, Bohle DS, Glassbrenner PA, Hansert B, Wink DA, Grisham MB. Modulation of superoxide-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide. *J Biol Chem*, 1996; 271: 40-47.

Miller NJ, Rice-Evans CA, Davies MJ. A novel method for measuring antioxidant capacity and ist application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci (Lond)*, 1993; 84: 407-412.

Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors Influencing the Antioxidant Activity Determined by the ABTS<sup>•+</sup> Radical Cation Assay. *Free Rad Res*, 1997; 26, 195-199.

MinerJC, Bissé E, Aebischer CP, Bell A, Wieland H, Lutschg J, "Assessment of vitamin B-12, folate, and vitamin B-6 status and relation to sulfur amino acid metabolism in neonates," *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2000; 72: 751–757.

Mira L, Fernández MT, Santos M, Rocha R, Florencio MH, Jennings KR. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic Res*, 2002; 36: 1199-1208.

Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR. Antioxidant and Prooxidant Actions of prenylated and Nonprenylated Chalcones and Flavanones in Vitro. *J Agr.& Food Chem*, 2000; 48: 3876-3884.

Mittal CK, Murad F. Properties and oxidative regulation of guanylate cyclase. *J Cyclic Nucleotide Res*, 1977; 3: 381-91.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Murphy, MS, "Growth factors and the gastrointestinal tract," *Nutrition*, 1998; 14: 771–774.

Mutlu B, AKsoy N, Cakir H, Celik H, Erel O. The effects of the mode of delivery on oxidative-antioxidative balance. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 2011; 24: 1367-1370.

Nagura J, Iso H, Watanabe Y, Maruyama K, Date C, Toyoshima H, et al. Fruit, vegetable and bean intake and mortality from cardiovascular disease among Japanese men and women: the JACC Study. *Br J Nutr* 2009; 102: 285-92.

Nathan C, Xien QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem*, 1994; 269: 13725-13728.

Nathan, C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest*, 2003; 111: 769–778.

Negrato CA, Gomes MB. Low birth weight: causes and consequences. *Diabetol Metab Syndr*, 2013; 5: 49.

Nelson M. *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*. Routledge Ed. New York, 2005. ISBN 0-203-30912-X master-e-book.

Nelson, Max. *The Barbarian's beverage. A History of Beer in Ancient Europe*. Ed. Taylor and Francis. 2004.

NewburgDS. Recent advances in human milk glycobiology. *Pediatr Res*, 2014; 75: 675-679.

NICE. National Institute for Health and Care Excellence. Maternal and child nutrition. NICE public health guidance 11. [guidance.nice.org.uk/ph/11](http://guidance.nice.org.uk/ph/11). London 2014.

Nicotra A, Pierucci F, Parvez H, Senatori O. Monoamine oxidase expression during development and aging. *Neurotoxicology*, 2004; 25: 155-65.

Nikniaz L, Mahdavi R, Ostadrahimi A, Hejazi MA, Vatankhah AM. Effects of Synbiotic Supplementation on Total Antioxidant Capacity of Human Breast Milk. *Breastfeeding Medicine*, 2013; 8: 217-222.

Novak, M. Food supplementation, nutritional intake of recipients and operational aspects: an integrated pilot nutrition initiative of BRAC. *Public Health Nutr*, 2006; 9: 557-

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

562.

O'Neil CE, Nicklas TA, Rampersaud GC, Fulgoni VL 3rd. 100% orange juice consumption is associated with better diet quality, improved nutrient adequacy, decreased risk for obesity, and improved biomarkers of health in adults: National Health and Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *Nutr J*, 2012; 11: 107.

Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, et al. Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72 h of life. *Free Radic Res*, 2003; 37: 317-322.

Olafsdottir AS, Thorsdottir I, Wagner KH, Elmadfa I. Polyunsaturated fatty acids in the diet and breast milk of lactating icelandic women with traditional fish and cod liver oil consumption. *Ann Nutr Metab*, 2006; 50: 270-276.

Olafsdottir AS, Wagner KH, Thorsdottir I, Elmadfa I. Fat-soluble vitamins in the maternal diet, influence of cod liver oil supplementation and impact of the maternal diet on human milk composition. *Ann Nutr Metab*, 2001; 45: 265-272.

Olalla J. La cerveza en España: una larga historia. En "El libro blanco de la cerveza". Ed. Cerveceros de España. Madrid, 2001.

Olson JA, Krinsky NL. Introduction: The colorful, fascinating world of the carotenoids: important physiologic modulators, *FASEB J*, 1995; 9: 15547-1550.

Omenn GS. Chemoprevention of lung cancers: lessons from CARET, the beta-carotene and retinol efficacy trial, and prospects for the future. *Eur J Cancer Prev*, 2007; 16: 184-191.

Ortega RM, Rodríguez-Rodríguez E. Ingestas recomendadas, ingestas óptimas e ingestas máximas tolerables. En: "Hot Topics" en vitaminas y salud. Alonso E, Varela G eds., IMC pg. 111-122. Madrid, 2011.

Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. National Academy of Sciences. Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements. Eds. New York, 2006. ISBN 0-309-65646-X.

Ozgova S, Hermanek J, Gut I. Different antioxidant effects of polyphenols on lipid peroxidation and hydroxyl radicals in the NADPH-, Fe-ascorbate- and Fe-microsomal systems. *Biochem Pharmacol*, 2003; 66: 1127-1137.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Ozgurtas T, Aydin I, Turan O et al., "Vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I and platelet-derived growth factor levels in human milk of mothers with term and preterm neonates". *Cytokine*, 2010; 50: 192–194.

Paganga G, Miller N, Rice-Evans CA. The polyphenolic content of fruit and vegetables and their antioxidant activities. What does a serving constitute? *Free Rad Res*, 1999; 30, 153–162.

Pallás Alonso CR, Colomer Revuelta J, Cortes Rico J, Esparza Olcina MJ, Galbe Sánchez Ventura J, García Aguado J, Martínez Rubio A, Mengual Gil JM, Merino Molina M, Sánchez Ruiz-Cabello FJ, Soriano Faura FJ. Suplementación de yodo en la gestación y la lactancia. *Revista de Pediatría de Atención Primaria*, 2014; 16:147-153.

Pamplona R. Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a causal role in aging and longevity. *Biochim Biophys, Acta* 2008; 1777: 1249-1262.

Pan MH, Ghai G, Ho CT. Food bioactives, apoptosis, and cancer. *Mol Nutr Food Res*, 2008; 52: 43-52

Park SG, Kim JH, Xia Y, Sung JH. Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin Ther Targets*, 2011; 15: 1297-1306.

Parker RS. Absorption, metabolism, and transport of carotenoids. *FASEB J*, 1996; 10: 542-551.

Parker RS. Bioavailability of carotenoids. *Eur J Clin Nutr*, 1997; 51: 86-90.

Pazos M, Andersen ML, Medina I, Skibsted LH. Efficiency of natural phenolic compounds regenerating  $\alpha$ -tocopherol from  $\alpha$ -tocopheroxyl radical. *J Agric Food Chem*, 2007; 55: 3661-3666.

Pfaender S, Heyden J, Friesland M, Ciesek S, Ejaz A, Steinmann J, Malarski A, Stoiber H, Tsiavaliaris G, Bader W, Pietschmann T, Steinmann E. Inactivation of hepatitis C virus infectivity by human breast milk. *J Infect Dis*, 2013; 208: 1943-1952.

Pierce , Legrand D, Mazurier J. La lactoferrine: une protéine multifonctionnelle. *Medecine/Sciences*, 2009; 25: 361-369.

Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Brusamolino A, Morazzoni P, Bombardelli E. Relationship between rate and extent of catechin absorption and plasma antioxidant

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

status. *Biochem Mol Biol Int*, 1998; 46: 895-903.

Plinio Segundo Cayo. "Historia Naturalis". Historia natural. Obra completa. Editorial Gredos. Madrid, 1995. ISBN 978-84-249-1684-8.

Poiroux-Gonord F, Bidel LP, Fanciullino AL, Gautier H, Lauri-Lopez F, Urban L. Health Benefits of Vitamins and Secondary Metabolites of Fruits and Vegetables and Prospects To Increase Their Concentrations by Agronomic Approaches. *J Agric Food Che*, 2010; 58: 12065-12082.

Polesel J, Negri E, Serraino D, Parpinel M, Barzan L, Libra M, et al. Dietary intakes of carotenoids and other nutrients in the risk of nasopharyngeal carcinoma: a case-control study in Italy. *Br J Cancer*, 2012; 107: 1580-1583.

Polibio. *Historias*. Trad. y notas de M. Balasch Recort. Intr. de A. Díaz Tejera. Rev.: J. M. Guzmán Hermida. Obra completa. Editorial Gredos. Barcelona, 1997. Libros V-XV. 1997. ISBN 978-84-249-0149-3.

Pomposiello PJ, Demple B. Global adjustment of microbial physiology during free radical stress. *Adv Microb Physiol*, 2002; 46: 319-341.

Postlethwait EM, Langford SD, Jacobson LM, Bidani A. NO<sub>2</sub> reactive absorption substrates in rat pulmonary surface lining fluids. *Free Radic Biol Med*, 1995; 19: 553-563.

Psaltopoulou T, Naska A, Orfanos P, Trichopoulos D, Mountokalakis T, Trichopoulou A. Olive oil, the Mediterranean diet, and arterial blood pressure: the Greek European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Am J Clin Nutr*, 2004; 80: 1012-1018.

Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Ochoa JJ., Battino M, Mataix J. Oxidative stress induced by exercise and dietary fat modulates the coenzyme Q and vitamin A balance between plasma and mitochondria. *Int J Vitam Nutr Res*, 1999; 69: 243-249.

Quiles JL, Ochoa JJ, Battino M, Gutierrez-Rios P, Nepomuceno EA, rias ML, Huertas Jr, Mataix J. Life-long supplementation with a low dosage of coenzyme Q10 in the rat: effects on antioxidant status and DNA damage. *Biofactors*, 2005; 25: 73-96.

Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, et al. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res*, 2006; 40: 199-206.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Radomski Mw, Palmer Rmj, And Moncada S. The anti-aggregating properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol*, 1987; 92: 639–646.

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*, 1999; 26: 1231-1237.

Reece-Stremtan S, Marinelli KA. ABM Clinical Protocol#21: Guidelines for Breastfeeding and Substance Use or Substance Use Disorder, Revised 2015. *Breastfeed Med*, 2015; 10: 135-141.

Reed GA. Co-oxidation of xenobiotics: lipid peroxy derivatives as mediators of metabolism. *Chem Phys Lipids*, 1987; 44: 127-148.

Renfrew MJ, McCormick FM, Wade A, Quinn B, Dowswell T. Support for healthy breastfeeding mothers with healthy term babies (Review)- The Cochrane collaboration, 2012. Wiley & Sons, 2012.

Rhee SG, Kang SW, Jeong W, Chang TS, Yang KS, Woo HA. *Curr Opin Cell Biol*, 2005; 17: 183–189.

Riccioni G, D'Orazio N, Palumbo N, Bucciarelli V, Ilio E, Bazzano LA, et al. Relationship between plasma antioxidant concentrations and carotid intima-media thickness: the Asymptomatic Carotid Atherosclerotic Disease In Manfredonia Study. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil*, 2009; 16: 351-357.

Riley PA. Free Radicals in Biology: Oxidative Stress and the Effects of Ionizing Radiation. *International Journal of Radiation Biology*, 1994; 65: 27-33.

Rivero D, Pérez-Magariño S, González-Sanjosé ML, Valls-Bellés V, Codoñer P, Muñiz 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.

Robles R, Palomino N, Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum Dev*, 2001; 65: S75-S81.

Rodríguez G. Estudio del contenido en antioxidantes (coenzima Q, tocoferol, retinol, ácido ascórbico y ácido úrico) minerales y perfil lipídico en leche humana en distintas etapas de su maduración: diferencias entre leche de madres con parto a término y

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

madres con parto prematuro. Tesis doctoral. Universidad de granada, Instituto de Nutrición y Tecnología de alimentos. Granada, 2009

Rodríguez RJ, Miranda CL, Stevens JF; Deinzer ML, Buhler DR. Influence of prenylated and non-prenylated flavonoids on liver microsomal lipid peroxidation and oxidative injury in rat hepatocytes. *Food Chem Toxicol*, 2001; 39: 437-445.

Román J. Efecto sobre la salud de la ingestión de cerveza sin alcohol y lúpulo en un colectivo de monjas de clausura. Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, 2007.

Romero-Alvira C, González-Martínez F. Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica. *An Esp Pediatr*, 1992; 36: 85-97.

Romeu Nadal M. Estudio de la conservación de la leche humana y de los preparados para lactantes. Barcelona: Universidad de Barcelona. Facultad de Farmacia. Departamento de Nutrición y Bromatología; 2006. ISBN: 8469028731.

Ronayne de Ferrer PA, Baroni A, Sambucetti ME, López NE, Ceriani Cernadas JM. Lactoferrin in term and preterm milk. *Journal of the American College of Nutrition*, 2000; 19: 370–373.

Rubbo H. Nitric oxide and peroxynitrite in lipid peroxidation. *Medicina (B Aires)*, 1998; 58: 361-366.

Rudgley, Richard . *The Alchemy of Culture: Intoxicants in Society*. British Museum Press. London, 1993. ISBN 978-0-7141-1736-2.

Rudolph HM, McGovern PE, Badler VR. Chemical evidence for ancient beer. *Nature*, 1992; 360: 24.

Ruiz E, Avila LM, Valero T, del Pozo S, Rodríguez P, Aranceta-Bartrina J, Gil A, González-Gross M, Ortega RM, Serra-Majem L, Varela-Moreiras G. Energy Intake, Profile, and Dietary Sources in the Spanish Population: Findings fo the ANIBES Study. *Nutrients*, 2015;7:4739-4762.

Rumsey SC, Levine M. Absorption, transport, and disposition of ascorbic acid in humans - Chemistry, Metabolism, and Uses. *J Nutr Biochem* 1998; 9: 116-130.

Ryter SW, Tyrrell RM. Singlet molecular oxygen ((1)O<sub>2</sub>): a possible effector of eukaryotic

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

gene expression. *Free Radic Biol Med*, 1998; 24: 1520-34.

Sachs HC and Committee on Drugs. The Transfer of Drugs and Therapeutics into Human Breast Milk: An Update on Selected Topics. *Pediatrics*, 2013; 132: e796.

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.

Sala-Vila A, Estruch R, Ros E. New Insights into the Role of Nutrition in CVD Prevention. *Curr Cardiol Rep*, 2015; 17: 583.

Salvini S, Parpinel M, Gnagnarella P, Maisonneuve P, Turrini A. Banda dati di composizione degli alimenti per studi epidemiologici in Italia. Istituto Europeo di Oncologia. Milano, 1998.

Sanchez L, Calvo M, Brock JH. Biological role of lactoferrin. *Arch Dis Child*, 1992 ; 67: 657-661.

Sánchez-Moreno C, Plaza L, de Ancos B, Cano MP. Quantitative bioactive compounds assessment and their relative contribution to the antioxidant capacity of commercial orange juice. *J Sci Food Agr*, 2003; 83: 430-9.

Sandal G, Uras N, Gokmen T, Oguz SS, Erdevi O, Dilmen U. Assessment of oxidant/antioxidant system in newborns and their breast milks. *J Maternal-Fetal Neon Med*, 2013; 26: 540-543.

Sansbury BE, Hill BG. Regulation of obesity and insulin resistance by nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 2014; 73C: 383-399.

Sartori AA, Jiricny J. Enzymology of base excision repair in the hyperthermophilic archaeon *Pyrobaculum aerophilum*. *J Biol Chem*, 2003; 278: 24563-24576.

Sasabe N, Keyamura Y, Obama T, Inoue N, Masuko Y, Igarashi Y, Aiuchi T, Kato R, Yamaguchi T, Kuwata H, Iwamoto S, Miyazaki A, Hara S, Yoshikawa T, Itabe H. Time course-changes in phosphatidylcholine profile during oxidative modification of low-density lipoprotein. *Lipids in Health and Disease*, 2014; 13: 48.

Saugstad OD, Aune D. Optimal oxygenation of extremely low birth weight infants: a meta-analysis and systematic review of the oxygen saturation target studies.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Neonatology, 2014; 105: 55-63.

Saugstad OD, Ramji S, Vento M: Oxygen for newborn resuscitation: how much is enough? Pediatrics, 2006; 118; 789-792.

Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. J Nutr, 2000; 130(8S Suppl): 2073S-2085S.

Schieber A, Stintzing FC, Carle R. By-products of plant food processing as a source of functional compounds: recent developments. Trends Food Sci Tech, 2001; 12: 401-413.

Schneider C, Thierauf A, Kempf J, Auwärter V. Ethanol Concentration In Breastmilk After The Consumption Of Non-Alcoholic Beer. Breastfeed Med, 2013 ; 8: 291-293.

Sendra JM, Carbonell JV. Capítulo 1. Introducción. En "Evaluación de las propiedades nutritivas, funcionales y sanitarias de la cerveza, en comparación con otras bebidas". Monografía. Centro de Información Cerveza y Salud. Madrid, 1999.

Sener G, Ozer Sehirlı A, Ipçi Y, Cetinel S, Cikler E, Gedik N, et al. Taurine treatment protects against chronic nicotine-induced oxidative changes. Fundam Clin Pharmacol, 2005; 19: 155-164.

Serra-Majem L, Ribas-BARba L, Salvador G, Jover L, Raidó B, Ngo J. Trends in energy and nutrient intake and risk of inadequate intakes in Catalonia, Spain (1992-2003). Public Health Nutr, 2007; 10: 1354-1367.

Sevanian A, Nordenbrand K, Kim E, Ernster L, Hochstein P. Microsomal lipid peroxidation: the role of NADPH-cytochrome P450 reductase and cytochrome P450. Free Radic Biol Med, 1990; 8: 145-152.

Shah MD, Sha R, Nutrient deficiencies in the premature infant. Pediatr Clin North Am, 2009; 56: 1069-1083.

Shan Q, Lu j, Zheng Y, Li J, Zhou Z, Hu B, Zhang Z, Fan S, Mao Z, Wang YJ, Ma D. Purple sweet potato color ameliorates cognition deficits and attenuates oxidative damage and inflammation in aging mouse brain induced by d-galactose. J Biomed Biotechnol, 2009; 2009: 564737. Epub 2009, Oct 26.

Shekeeb Shahab M, Kumar P, Sharma N, et al. Evaluation of oxidant and antioxidant status in term neonates: A plausible protective role of bilirubin. Mol Cell Biochem, 2008;

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

317: 51–59.

Shim J-S, OhK, Kim HK. Dietary Assessment methods in epidemiologic studies. *Epidemiology and Health* 2014; 35, e2014009 <http://dx.doi.org/10-4178/epih/e2014009>

Shoeb M, Jaspars M, MacManns SM, Celik S, Nahar L, Kong-Thoo-Lin P, Sarker SD. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *centaurea gigantea* (Asteraceae) *J Nat Med*, 2007; 61: 164-169.

Shohi H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr opin Clin Nutr metab Care* 2007; 10: 324-328

Shohi H, Oguchi S, ShimizuT, Yamashiro Y. Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in infants. *Pediatr Res*, 2003; 53: 850-852.

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 Ed*, 2004; 89: F136-F-138.

Sies H. Physiological society symposium: impaired endothelial and smooth muscle cell function in oxidative stress oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, 1997; 82; 291-295.

Silencio Barrita JL, Santiago Sanchez MS. Chapter 18. Antioxidant Role of Ascorbic Acid and His Protective Effects on Chronic Diseases. En: *Agricultural and Biological Sciences. "Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants"*. Morales-González JA Ed. ISBN 978-953-51-1123-8, México DF, 2013.

Silvestre Castelló D. I.3. Situaciones Fisiológicas y Etapas de la Vida. I.3.a. Salud nutricional de la mujer gestante y lactante. En: *Libro Blanco de la Nutrición en España*. FEN ed 2013, pg 47-54.

Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods Enzymol*, 1999; 299: 152–178.

Small E, Catling PM, 1999. "Humulus Lupulus. Myths and Facts", In, *Canadian Medical Crops*. Ed. National Research Council of Canada. NRC Research Press. Ottawa, Ontario, Canada, 1999. p 78. ISBN 0-660-17534-7.

Smith JP, Harvey PJ. Chronic disease and infant nutrition: is it significant to public health? *Public Health Nutrition*, 2011;.1:.1-11.

Soda K, Kano Y, Chiba F. Food polyamine and cardiovascular disease, an

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

epidemiological study. *Glob J Health Sci*, 2012; 4: 170-178.

Song BJ, Jouni ZE, Ferruzzi MG. Assessment of phytochemical content in human milk during different stages of lactation. *Nutrition*, 2013; 29:195-202.

Stadtman ER, Berlett BS. Protein oxidation in ageing, disease, and oxidative stress. *Chem. Res. Toxicol*, 1997; 10: 485–494.

Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*, 2003; 25: 207-218.

Stahl W, van den Berg H, Arthur J, Bast A, Dainty J, Faulks RM, et al. Bioavail Metabol Mol Aspects Med, 2002; 23: 39-100.

Steffen LM, Kroenke CH, Yu X, Pereira MA, Slattery ML, Van Horn L, et al. Associations of plant foods, dairy product, and meat intakes with 15 years incidence of elevated blood pressure in young black and white adults: the Coronary Artery Risk Development in Young Adults (CARDIA) Study. *Am J Clin Nutr*, 2005; 82: 1169-1177.

Styskal J, Van Remmen H, Richardson A, Salmon AB. Oxidative stress and diabetes: what can we learn about insulin resistance from antioxidant mutant mouse models? *Free Radic Biol Med*, 2012; 52: 46-58.

Szlagatys-Sidorkiewicz A, Zagierski M, Jankowska A, et al. Longitudinal study of vitamins A, E and lipid oxidative damage in human milk throughout lactation. *Early Hum Dev*, 2011; 88: 421–424.

Tang PH, Miles MV, Steele P, et al. Determination of coenzyme Q10 in human breast milk by high-performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 2006; 20: 1336–1343.

Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. *Trends Cell Biol*, 2005; 15: 319–326.

Tian L, Cai Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radic Biol Med*, 1998; 24: 1477-84.

Tijerina-Saenz 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.

Tin W, Gupta S. Optimum oxygen therapy in preterm babies. *Arch Dis Child Fet Neonatal Ed*, 2007; 92: F143-F147.

Todoroki Y, Tsukahara H, Ohshima Y, Shukunami K, Nishijima K, Kotsuji F, Hata A, Kasuga

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- K, Sekine K, Nakamura H, Yodoi J, Mayumi M. Concentrations of thioredoxin, a redox-regulating protein, in umbilical cord blood and breast milk. *Free Radic Res*, 2005; 39: 291-297.
- Tolbert NE, Essner E. Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. *J Cell Biol*, 1981; (3 Pt 2): 271s-283s.
- Tomas-Barberan J J, Clifford M N. Flavonones, chalcones and dihydrochalcones-nature, occurrence an dietary burden. *J Sci Food Agric*, 2000; 80: 1073-1080.
- Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, et al. Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2 $\alpha$ -deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: Its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest*, 1997; 76: 365-374.
- Tsai JH, Chen HW, Chen YH, Liu JY, Lii CK, "The protection of hepatocyte cells from the effects of oxidative stress by treatment with vitamin e in conjunction with DTT," *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010; 2010: 486267. Epub 2010 May 18.
- Tulard A, Hoffschir F, de Boisferon FH, Luccioni C, Bravard A. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Radic Biol Med*, 2003; 35: 68-77.
- Turfkruyer M, Verhasselt V. Breast milk and its impact on maturation of the neonatal immune system. *Curr Opin Infect Dis*, 2015; 28: 199-206.
- Turrens JF, Boveris A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J*, 1980; 191: 421-427.
- Urbina-Bonilla A. Nuevo papel de los radicales libres de oxígeno en el ejercicio: ¿otra paradoja? *Colombia Médica*, 2008; 39: 266-275.
- Valent F, Horvat M, Mazej D, Stibilj V, Barbone F. Maternal diet and selenium concentration in human milk from an Italian population. *J Epidemiol*, 2011; 21: 285-292.
- Valko M, Izakovic M, Mazur M, Rhodes CJ, Telser J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem*, 2004; 266: 37-56
- Valls V, Torres MC, Boix L, González San José ML, Muñoz P, Rivero D, Codoñer P. "Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante in vivo: en ratas y en patologías asociadas a los radicales libres". Monografía. Ed. Valls Bellés V y Codoñer Franch P. Centro de Información Cerveza y Salud, Ed. 2005.
- Valls V, Torres MC, Boix L, Codoñer P. Actividad antioxidante de la cerveza: estudios in vitro e in vivo. Monografía. Ed. González ML, Muñoz P, Valls V. Centro de

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Información Cerveza y Salud, Ed. Madrid, 2001.

Valls-Bellés V, González P, Muñiz P. Epicatechin effect on oxidative damage induced by tert-BOOH in isolated hepatocytes of fasted rats. *Proc Biochem*, 2004; 39: 1525-1531.

Valls-Bellés V, Codoñer-Franch P, González San José ML, Muñiz Rodríguez P. Biodisponibilidad de los flavonoides de la cerveza. Efecto antioxidante "in vivo". Monografía. Centro de Información Cerveza y Salud, Ed. Madrid, 2005.

Valls-Bellés V, Torres MC, Muñiz P, Beltran S, Martínez-Alvarez JR, Codoñer-Franch P. Defatted milled grape seed protects adriamycin-treated hepatocytes against oxidative damage. *Eur J Nutr*, 2006; 45: 251-258.

Valls-Bellés V, Torres MC, Boix L, Muñiz P, Gonzalez-Sanjose ML, Codoñer-Franch P. alpha-Tocopherol, MDA-HNE and 8-OHdG levels in liver and heart mitochondria of adriamycin-treated rats fed with alcohol-free beer. *Toxicology*, 2008; 249: 97-101.

Van Duyn MA, Pivonka E. Overview of the health benefits of fruits and vegetables consumption for the dietetics professional: selected literature. *J Am Diet Assoc*, 2000; 100: 1511-1521.

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.

Velazquez Vazquez C, Villa Rojas MG, Alvarez Ramirez C, Chávez-Servín JL, García-Gasca T, Ferriz Martínez R, Garcia OP, Rosado JL, López-Sabater CM, Castellote AI, Andrade Montemayor HM, de la Torre Carbot K.. Total phenolic compounds in milk from different species. Design of an extraction technique for quantification using the Folin-Ciocalteu method. *J Food Chemistry*, 2015; 176:480-486

Vento M, Asensi M, Sastre J, García-Sala F, Pallardó FV, Viña J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics*, 2001; 107: 642-647.

Verduci E, Banderali G, Barberi S, Radaelli G, Lops A, Betti F, Riva E, Giovannini M. Epigenetic effects of human Breast Milk. *Nutrition*, 2014; 6: 1711-1724.

Vernin, G. and Parkanyi, C. Mechanism of formation of heterocyclic compound in Maillard and pyrolysis reactions. In: *The Chemistry of heterocyclic compounds in flavours and aromas*, ed. G. Vernin. Ellis Horwood, Chichester, 1982. pp:151-207.

Vickers MH. Developmental programming of the metabolic syndrome—Critical windows for intervention. *World J Diabetes*, 2011; 2: 137–148.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Villar-Vidal M, Amiano P, Rodríguez C, Santa Marina L, Mozo I, Vioque J, Navarrete-Muñoz EM, Romaguera D, Valvi D, Fernández A, Tardón A, Ibarluzea J. Compliance of nutritional recommendations of Spanish pregnant women according to sociodemographic and lifestyle characteristics: a cohort study. *Nutr Hosp*, 2015; 31: 1803-1812.

Viña J, Saez GT, Wiggins D, Roberts AF, Hems R, Krebs HA. The effect of cysteine oxidation on isolated hepatocytes. *Biochem J*, 1983; 212: 39-44.

Vinson JA, Jang J, Yang J, Dabbagh Y, Liang X, Serry M, Proch J, Cai S. Vitamins and especially flavonoids in common beverages are powerful in vitro antioxidants which enrich lower density lipoproteins and increase their oxidative resistance after ex vivo spiking in human plasma. *J Ag Food Chem*, 1999; 47: 2502-2504.

Vioque J, Weinbrenner T, Castelló A, Asensio L, Garcia de la Hera M. Intake of fruits and vegetables in relation to 10-year weight gain among Spanish adults. *Obesity (Silver Spring)*, 2008; 16: 664-670.

Viqueira Caamaño JA. Toxicidad por oxígeno, monóxido de carbono y dióxido de carbono. *JANO*, 2008; 1707: 23-30.

Vita JA. Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *Am J Clin Nutr*, 2005; 81 (1 Suppl): 292S-297S.

Vladimirov YA. Free radical lipids peroxidation in biomembranes: Mechanism, regulation and biological consequences. Johnson JE, Walford R, Harman D, Miquel J, Liss AR, editors. *Free radicals, aging and degenerative diseases*. Edit. Liss New York; 1986.

Von Sonntag, C. *Free-radical-induced DNA Damage and Its Repair*, Ed: Springer-Verlag. Basel, 2006.

Walker CJ, Bolshaw L, Chandra S. Healthy Drinks? Beer and Cider Antioxidants. *Proc Eur Brew ConvCong*, Budapest, 2001. pp. 92-101.

Waly MI, Hornig M, Trivedi M, Hodson N, Kini R, Ohta A, Deth R. Prenatal and postnatal epigenetic programming: implications for GI, Immune, and neuronal function in autism. *Autism Research and Treatment*, 2012; 2012: 190930. Epub 2012, jun19.

Wang Y, Lloyd B, Yang M, Davis CG, Lee SG, Lee W, et al. Impact of orange juice consumption on macronutrient and energy intakes and body composition in the US population. *Public Health Nutr*, 2012; 15: 2220-2227.

Watts SD, Torres-Salazar D, Divito CB, Amara SG. "EAAT3 cysteine transport: potential mechanism of cysteine binding and translocation," in *Proceedings of the Society for*

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Neuroscience Meeting, November 2009.

Weiss SJ, LoBuglio AF. Phagocyte-generated oxygen metabolites and cellular injury. *Lab Invest* 1982; 47: 5-18.

Wende Li, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*, 2009; 25: 105-114.

Whitehead TP, Robinson D, Allaway S, Syms , Hale A. Effect of red wine ingestion on the antioxidant capacity of serum. *Clin Chem*, 1995; 41: 32-35.

Wijnhoven TMA, Bollars C, Tabacchi G, Hermoso M. Collate and review data on the composition and volume and intake of breastmilk. Results from a systematic literature review. *European micronutrient recommendations Aligned*. 2011, p 1-136.  
[www.eurreca.org](http://www.eurreca.org).

Williamson G. Protective effects of fruits and vegetables in the diet. *Nutr Food, Sci* 1999; 1: 6-10.

Wokcij KY, Rechtman DJ, Lee ML. Macronutrient analysis of a Nationwide Sample of Donor Breast Milk. *J Am Diet Assoc*, 2009; 109: 137-40.

Yahvah KM, Brooker SL, Williams JE, Settles M, McGuire MA, McGuire MK. Elevated dairy fat intake in lactating women alters milk lipid and fatty acids without detectible changes in expression of genes related to lipid uptake or synthesis. *Nutr Res*, 2015; 35: 221-228.

Yamada T, Hayasaka S, Shibata Y, Ojima T, Saegusa T, Gotoh T, Ishikawa S, Nakamura Y, Kayaba K. Frequency of Citrus Fruit Intake Is Associated With the Incidence of Cardiovascular Disease: The Jichi Medical School Cohort Study. *J Epidemiol*, 2011; 21: 169-175.

Yao L, Friel JK, Suh M, Diehl-Jones WL. Antioxidant properties of breast Milk in a Novel in Vitro Digestion/Enterocyte Model. *JPGN*, 2010; 50: 670-676.

Yeung MY. Influence of early postnatal nutritional management on oxidative stress and antioxidant defence in extreme prematurity. *Acta Paediatr*, 2006; 95: 153-163.

Yoshida H, Kisugi R. Mechanisms of LDL oxidation. *Clin Chim Acta*, 2010; 411: 1875-82.

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*, 2013; 4: 514, eCollection 2014. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24409188>. Last access: 19 Feb, 2014.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*, 2001; 385: 20-27.

Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol*, 2001; 54: 176-186.

Yu BP. Membrane alteration as a basis of aging and the protective effects of calorie restriction. *Mech Ageing Dev*, 2005; 126: 1003-1010.

Yuan JM, Stram DO, Arakawa K, Lee HP, Yu MC. Dietary cryptoxanthin and reduced risk of lung cancer: the Singapore Chinese Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003; 12: 890-898.

Yuan Q, Zhu X, Sayre LM. Chemical nature of stochastic generation of protein-based carbonyls: metal-catalyzed oxidation versus modification by products of lipid oxidation. *Chem Res Toxicol*, 2007; 20: 129-139.

Yuan-Shun L, Yi-Hung C. Antioxidant profiles in full term and preterm neonates. *Chang Gung Med J*, 2005; 28: 846-851.

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; 45:1 50–154.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the Cu Zn-SOD (SOD1), Mn(SOD)(SOD2) and EC-SOD(SOD3) gene structures, evolution and expression. *Free Radic Biol, Med* 2002; 33: 337-349.

Zipprich J, Terry MB, Liao Y, Agrawal M, Gurchich I, Senie R, Santella RM. Plasma Protein Carbonyls and Breast Cancer Risk in Sisters Discordant for Breast Cancer from The New York Site of the Breast Cancer Family Registry. *Cancer Res*, 2009; 69: 2966-2972.

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

## IX. ANEXOS



## IX. ANEXOS

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

## ANEXO 1. ÍNDICE DE FIGURAS.

### ANEXO 1. INDICE DE FIGURAS

FIGURA I-1. DESEQUILIBRIO OXIDATIVO.....	13
FIGURA I-2. DESACTIVACIÓN DE UN RL POR UN ANTIOXIDANTE.....	14
FIGURA I-3. ESTRUCTURA QUÍMICA BÁSICA DE POLIFENOLES PRESENTES EN LOS ALIMENTOS. ....	22
FIGURA I-4. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS POLIFENOLES Y ACCIONES ANTIOXIDANTES .....	23
FIGURA V-1. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE MATERNA ABTS <sup>+</sup> .....	116
FIGURA V-2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE MATERNA DPPH.....	118
FIGURA V-3. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE MEDIDA DE LA LECHE MATERNA FRAP.....	120
FIGURA V-4. CONTENIDO EN POLIFENOLES EN LECHE MATERNA .....	122
FIGURA V-5.- DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE Q <sub>10</sub> EN LA LECHE MATERNA.....	124
FIGURA V-6. EVOLUCION DEL DAÑO OXIDATIVO PROTEÍNAS NEONATALES .....	126
FIGURA V-7. EVOLUCION DEL DAÑO OXIDATIVO A LIPIDOS NEONATALES.....	128
FIGURA V-8. EVOLUCION DEL DAÑO OXIDATIVO AL ADN NEONATAL.....	130

## ANEXO 2. INDICE DE TABLAS

## ANEXO 2. INDICE DE TABLAS

### ANEXO 2. INDICE DE TABLAS:

TABLA I-1. ESPECIES REACTIVAS MÁS RELEVANTES.....	5
TABLA I-2 ANTIOXIDANTES DE FASE LIPÍDICA .....	15
TABLA I-3 ANTIOXIDANTES DE FASE ACUOSA.....	15
TABLA I-4. ENZIMAS ANTIOXIDANTES .....	16
TABLA I-5. PRINCIPALES COMPONENTES DE LA CERVEZA.....	56
TABLA I-6. DENSIDAD VITAMÍNICA DE LA CERVEZA COMPARADO CON OTROS ALIMENTOS .....	728
TABLA I-7. CONTENIDO MEDIO EN ANTIOXIDANTES DE LA CERVEZA PILSEN.....	59
TABLA I-8. COMPOSICIÓN DE LAS CERVEZAS SIN ALCOHOL ESPAÑOLAS .....	60
TABLA I-9 COMPARACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE CERVEZAS CON Y SIN ALCOHOL .....	60
TABLA I-10 COMPARACIÓN DE LA COMPOSICION FENOLICA DE LA CERVEZA ESPAÑOLA.....	61
TABLA II-1. COMPOSICIÓN DE LA CERVEZA SIN ALCOHOL UTILIZADA COMO SUPLEMENTO.....	85
TABLA V-1. CARACTERÍSTICAS DE LAS PARTICIPANTES.....	95
TABLA V-2. DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS OBTENIDAS EN SUERO MATERNO. ....	96
TABLA V-3. INGESTA MEDIA DE MADRES LACTANTES: MACRONUTRIENTES Y MINERALES. ....	97
TABLA V-4. INGESTA MEDIA DE MADRES LACTANTES: VITAMINAS.....	98
TABLA V-5. INGESTA MEDIA DE MACRONUTRIENTES .....	99
TABLA V-6. INGESTA DE ACIDOS GRASOS .....	100
TABLA V-7. CÁLCULO DE LA PREVALENCIA DE INGESTAS INADECUADAS POR DEFECTO. ....	1131
TABLA V-8. CÁLCULO DE LA PREVALENCIA DE INGESTAS INADECUADAS POR EXCESO. ....	1142
TABLA V-9. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LECHE MEDIDA CON ABTS.....	103
TABLA V-10. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LECHE MEDIDA CON DPPH .....	1175
TABLA V-10. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LECHE MEDIDA CON FRAP.....	1177
TABLA V-12. CONTENIDO EN POLIFENOLES DE LA LECHE MATERNA .....	1219
TABLA V-13. CONTENIDO EN COQ10 DE LA LECHE MATERNA.....	123
TABLA V-14. EVOLUCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO NEONATAL INFLIGIDO A PROTEÍNAS.....	125
TABLA V-15. EVOLUCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO NEONATAL INFLIGIDO A LÍPIDOS .....	127
TABLA V-16. EVOLUCIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO NEONATAL INFLINGIDO AL ADN .....	129
TABLA VI-1. INGESTA MEDIA COMPARACIÓN CON RESULTADOS DE QUILES .....	140

## ANEXO 2. INDICE DE TABLAS

TABLA VI-2. INGESTA HABITUAL DE GRASA .....	14330
---	-------

## ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

### ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

La lactancia materna es el alimento diseñado por la naturaleza para la alimentación y crianza del bebé humano, sus propiedades únicas de especie, aseguran un desarrollo óptimo del niño y protegen la salud de la madre y de su hijo amamantado. En la actualidad se recomienda la alimentación del lactante con leche humana exclusiva hasta los 6 meses y complementada con otros alimentos hasta los 2 años o más. Los beneficios de la leche humana suponen que los lactantes amamantados se desarrollan con todo su potencial y alcanzan coeficientes intelectuales más altos que los no amamantados. Además padecen menos enfermedades no sólo durante el tiempo de amamantamiento sino años después, padeciendo menos enfermedades crónicas como la obesidad, la arterioesclerosis, la diabetes mellitus e incluso algunos tipos de cánceres. La madre que amamanta también protege su salud y previene enfermedades como el cáncer de mama, la hipertensión, la artritis reumatoide o la obesidad. Parte de estas propiedades beneficiosas se atribuyen a la capacidad antioxidante de la leche humana, pero los componentes específicos con esta capacidad antioxidante no son todavía bien conocidos. Por ello, un equipo de profesionales de la Agencia Valenciana de Salud en el Hospital Dr. Peset y el Centro de Salud de Fuente de San Luís, en colaboración con el departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valencia han diseñado el estudio titulado: "Influencia de la dieta materna en la capacidad antioxidante de la leche humana y sus repercusiones en el lactante". Este estudio tiene como objetivo analizar las propiedades antioxidantes de la leche humana en relación con la dieta que come su madre y como esto influye en el lactante.

Solicitamos su colaboración en este estudio y le pedimos que nos permita obtener muestras de sangre, leche y orina suyas y de orina de su hijo o hija durante el primer mes de vida. Estas muestras se tomarán en los primeros días tras el nacimiento en el Hospital Dr. Peset, y después a los 15 días y al mes de vida. Su participación en el estudio terminará tras la visita del mes. Durante este mes de

### ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

seguimiento y para evitarle desplazamientos innecesarios las visitas del estudio coincidirán con los controles de salud del programa de salud del niño de la Conselleria de Sanitat. Por este motivo las visitas de los 15 días y del mes, así como la primera visita del recién nacido a las 48 horas tras la salida del hospital se realizarán en el Centro de Salud de la Fuente de San Luis en la consulta de pediatría nº 6 con la Dra Maite Hernández y la enfermera Cinta Borja y ustedes no precisarán acudir al Centro de Salud que les corresponda por zona. Al finalizar la última visita del seguimiento (al mes de vida de su hijo o hija) se le hará entrega de un pequeño obsequio como agradecimiento a su participación y una carta para entregar a su pediatra al objeto de que conozca su participación en este estudio. Para las siguientes visitas del Programa de Salud deberán ustedes acudir al Centro de Salud al que estén adscritos. Para cualquier duda o problema sobre lactancia materna y si así lo desean podrán ustedes acudir a la Consulta de Lactancia del Centro de Salud de Fuente de San Luis, previa petición de cita.

Durante el mes de seguimiento se le pedirá que registre usted su dieta en 3 ocasiones, por escrito. Durante el primer mes no debe tomar café, té o chocolate ya que interferiría con el objetivo del estudio. Se le proporcionará toda la ayuda necesaria para que usted pueda alimentar a su bebé con leche materna. En este estudio sólo pueden participar los bebés y las madres que amamantan, Las muestras obtenidas durante el estudio se destinarán únicamente a los fines de investigación definidos en el mismo.

Los datos que se le soliciten tendrán carácter estrictamente confidencial.

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

Dña....., de....años de edad y con DNI nº....., manifiesta que ha sido informada sobre los beneficios que podría suponer el análisis

### ANEXO 3. CONSENTIMIENTO INFORMADO

de mi leche junto al análisis de orina de mi hijo/a.....y de mi orina, así como a la extracción de un volumen de 10 mL de mi sangre, para llevar a cabo la investigación "Influencia de la dieta en la capacidad antioxidante de la leche humana y su repercusión en el lactante".

He sido informada de los posibles perjuicios que la extracción de una muestra de 10 mL de sangre puede tener sobre mi bienestar y salud.

He sido también informada de que nuestros datos personales serán protegidos e incluidos en un fichero que deberá estar sometido a y con las garantías de la ley 15/1999 de 13 de diciembre.

Tomando ello en consideración, OTORGO mi CONSENTIMIENTO a

Análisis de mi leche

Análisis de la orina de mi hijo/a

Análisis de mi orina

Extracción de 10 mL de mi sangre

Y que todo ello sea utilizado para cubrir los objetivos especificados en el proyecto.

Valencia, a.....de.....de 200...

Fdo. Dña

## ANEXO 4. CARTA PARA MADRES Y PADRES

### ANEXO 4. CARTA PARA LAS MADRES Y PADRES

Centro de Salud Fuente de San Luís  
Arabista Ambrosio Huici 30  
Consulta de Lactancia Materna  
Tfno 961972861

Fecha\_\_\_\_\_

Estimados padres de \_\_\_\_\_

Tras finalizar la participación en el estudio sobre las propiedades antioxidantes de la leche materna que se realiza en colaboración con el Hospital Dr Peset y el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina queremos agradeceros vuestra participación con un pequeño obsequio que esperamos os resulte útil.

A partir de ahora y a la mayor brevedad posible es importante que os pongáis en contacto con vuestro centro de salud y solicitéis fecha para las próximas citas del programa de salud del niño. Os entregamos una carta para vuestro pediatra que podéis entregar en la primera visita que realicéis en el centro de salud.

Fdo:

M<sup>º</sup> Teresa Hernández Aguilar, pediatra

## ANEXO 5. REGISTRO DE 24 HORAS

### ANEXO 5. MODELO DE REGISTRO DE 24 HORAS

Nombre y apellidos:  
Desperté a las

Fecha:  
Me acosté a las:

HORA	ALIMENTO	CANTIDAD	MODO PREPARACION  (detallar ingredientes)	OBSERVACIONES
desayuno				
ALMUERZO				
MERIENDA				
CENA				
RESOPON				

## ANEXO 6. CARTA AL PEDIATRA

### ANEXO 6. CARTA AL PEDIATRA

Centro de Salud Fuente de San Luís  
Arabista Ambrosio Huici 30  
Consulta de Lactancia Materna  
Tfno 961972861

Fecha\_\_\_\_\_

Estimad\_ compañer\_,

Hemos estado siguiendo a tu paciente \_\_\_\_\_ en esta consulta de lactancia por haber aceptado participar en el estudio de antioxidantes y leche materna. Este estudio se realiza en colaboración con el Hospital Dr Peset y el Departamento de Pediatría de la Facultad de Medicina.

Para facilitar a las madres participantes, su asistencia, se realizan las revisiones del recién nacido, de los 15 días y del mes, en esta consulta aprovechando las citas en las que está citada para los controles que precisa el estudio.

En este momento y habiendo finalizado su participación la remitimos de nuevo a tu consulta para los controles habituales.

Quedamos a tu disposición para ulteriores consultas de lactancia si precisaras

Un saludo afectuoso

Dra M<sup>a</sup> Teresa Hernández Aguilar

## ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS

### ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS:

<b>1<sup>o</sup><sub>2</sub></b>	Oxígeno singlete
<b>8-OHdG</b>	8-hidroxi-2'-deoxiguanosina
<b>ABTS</b>	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)
<b>ADN</b>	Ácido deoxirribonucleico
<b>AESAN</b>	Agencia de Seguridad Alimentaria y Nutrición
<b>AGEs</b>	Productos avanzados de glicación
<b>AGM</b>	Ácidos grasos monoinsaturados
<b>AGP</b>	Ácidos grasos poliinsaturados
<b>AGS</b>	Ácidos grasos saturados
<b>AK</b>	Adenilato Kinasa
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>Aox</b>	Actividad antioxidante
<b>ARE</b>	Elementos de respuesta a antioxidantes
<b>ARN</b>	Ácido ribonucléico
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>Ca</b>	Calcio
<b>CAT</b>	Capacidad antioxidante Total
<b>Catq</b>	Catequinas
<b>CGC</b>	Contenido en grupos carbonilo
<b>Cl</b>	Cloro
<b>ClH</b>	Acido Clorhidrico
<b>CoQ10</b>	Coenzima Q10
<b>Cu</b>	Cobre
<b>ChO</b>	Hidratos de carbono
<b>d</b>	día

## ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS

<b>DS</b>	Desviación standard
<b>DHA</b>	Acido docosahexaenóico
<b>dL</b>	decilitro
<b>DNFH</b>	2,4-dinitrofenilhidrazina
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<b>DT-diaforasa</b>	NADPH-quinona oxidoreductasa
<b>e<sup>-</sup></b>	electrón
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiamino tetracético
<b>EEUU</b>	Estados Unidos
<b>EFSA</b>	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
<b>EFV</b>	Factor de crecimiento endotelio vascular
<b>EGF</b>	Factor de crecimiento epidérmico
<b>EMR</b>	Estimación media de requerimientos
<b>eNOS</b>	Sintetasa del Acido Nitrico endotelial
<b>EPA</b>	Acido eicosapentanóico
<b>EU</b>	Unión Europea
<b>Fe</b>	Hierro
<b>FeCl<sub>3</sub></b>	Cloruro férrico
<b>FeSO<sub>4</sub></b>	Sulfato ferroso
<b>FGF</b>	Factor estimulante de fibroblastos
<b>FRAP</b>	Capacidad antioxidante mediante reducción férrica (Ferric reduction antioxidant power)
<b>g</b>	gramo
<b>GFNr</b>	Factor estimulador de granulocitos
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa
<b>GSH</b>	Glutación reducido, γ-glutamil-cisteinil-glicina
<b>GSSG</b>	Glutación oxidado, glutación disulfuro
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Agua

## ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS

<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HC</b>	Hidratos de carbono
<b>HDL</b>	Lipoproteínas de alta densidad
<b>HDL-c</b>	Lipoproteínas de alta densidad colesterol
<b>HGF</b>	Factor estimulante de hepatocitos
<b>HPLC</b>	Cromatografía líquida de alta resolución.
<b>Hx</b>	Hipoxantina
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento Insulina-like tipo I
<b>IL</b>	Interleukina
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>iNOS</b>	Sintetasa del Ácido Nítrico inducible
<b>IOM</b>	Instituto de Medicina de Estados Unidos
<b>K</b>	Potasio
<b>L</b>	litro/leche
<b>LDH</b>	Lactato deshidrogenasa
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de elevada densidad
<b>LM</b>	Leche Materna o Lactancia Materna
<b>LME</b>	Lactancia Materna Exclusiva
<b>LMP</b>	Lactancia Materna Parcial
<b>mcg</b>	microgramos
<b>MDA</b>	Malondialdehído
<b>MDH</b>	Malato deshidrogenasa
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>mg</b>	miligramos
<b>MIT</b>	Ingesta máxima tolerable

## ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS

<b>mL</b>	mililitros
<b>mmHg</b>	milímetros de mercurio
<b>Mn</b>	Manganeso
<b>MONICA</b>	Monitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease
<b>Na</b>	Sodio
<b>Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub></b>	Carbonato sódico
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
<b>NaOH</b>	Hidróxido Sódico
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazolio
<b>NER</b>	Reparación de escisión de nucleótido
<b>ng</b>	nanogramos
<b>NF</b>	Factor de transcripción de Neutrófilos
<b>nm</b>	nanómetros
<b>nmol</b>	nanomoles
<b>nNOS</b>	Sintetasa del Acido Nítrico neuronal
<b>NO<sup>•</sup></b>	Óxido nítrico
<b>NO<sub>2</sub><sup>•</sup></b>	Dióxido de nitrógeno
<b>NOS</b>	Especie reactiva oxigénica de Nitrógeno
<b>NOSn</b>	Óxido nítrico sintasa
<b>NOX</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxígeno molecular
<b>O<sub>2</sub><sup>•-</sup></b>	Anión superóxido
<b>OH<sup>•</sup></b>	Radical hidroxilo
<b>ONOO<sup>•</sup></b>	Peroxinitrito
<b>p</b>	significación estadística
<b>P75</b>	Percentil 75

## ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS

<b>pg</b>	picogramos
<b>PGE</b>	Prostaglandinas
<b>pMol</b>	picomoles
<b>PpO<sub>2</sub></b>	Presión parcial de Oxígeno
<b>PPT</b>	Polifenoles totales
<b>PRO</b>	Procianidina
<b>Prot</b>	Proteínas
<b>QH<sub>2</sub></b>	Ubiquinol
<b>r.p.m.</b>	Revoluciones por minuto
<b>RDA</b>	Recommended dietary allowances
<b>RDI/RDA</b>	Ingesta Dietética Recomendadas (Recommended Dietary Allowances)
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>REDOX</b>	Oxido-reducción
<b>RER</b>	Rango estimado de requerimientos
<b>RL</b>	Radical libre
<b>RNS</b>	Especies reactivas del nitrógeno
<b>RO<sup>•</sup></b>	A lcoxilo
<b>ROH</b>	Radical hidroxilo
<b>ROO<sup>•</sup></b>	Peroxilo
<b>ROOH</b>	Radical alquilo
<b>ROS</b>	Rspecies reactivas del oxígeno, especies oxigénicas reactivas
<b>S</b>	Azufre
<b>SAHM</b>	S-adenosil homocisteína
<b>SAM</b>	S-Adenosil metionina
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>Se</b>	Selenio
<b>Si</b>	Sílice

## ANEXO 7. TABLA DE ABREVIATURAS

<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>TEAC</b>	Capacidad antioxidante medida en equivalentes de Trolox
<b>TG</b>	Triglicéridos
<b>TGF-alfa</b>	Factor transformador del crecimiento alfa
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>Tox</b>	Tiorredoxina
<b>TPTZ</b>	2,4,6-tri-(2-piridil)-s-triazina
<b>TROLOX</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>UI</b>	UNIDADES INTERNACIONALES
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>UVB</b>	Rayos ultravioletas B
<b>vit</b>	vitamina
<b>VLDL</b>	Lipoproteínas de muy baja densidad
<b>X</b>	Xantina
<b>XDH</b>	Xantina Deshidrogenasa
<b>XO</b>	Xantina Oxidasa
<b>Zn</b>	Cinc
<b>µL</b>	microlitro
<b>µMol</b>	micromoles
<b><math>\bar{x}</math></b>	media estadística