



VNIVERSITAT E VALÈNCIA

**PAPEL DE LA MELATONINA EN LA CAPACIDAD
ANTIOXIDANTE DEL CALOSTRO Y LECHE HUMANA
MADURA. DIFERENCIAS ENTRE PARTO VAGINAL Y
PARTO POR CESÁREA**

Programa Doctorado en Medicina 3139

Tesis Doctoral

Presentada por

SONIA APARICI GONZALO

Dirigida por

Profesora Dra. Pilar Codoñer Franch

Diciembre 2020

INFORME DIRECTOR PER A DIPÒSIT DE TESI

Directora :

Cognoms, Nom: **CODOÑER FRANCH, PILAR**

N.I.F: .19871311R

Departament/Institut: PEDIATRIA, OBSTETRICIA I GINECOLOGIA

Centre: UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Com a directora de la tesi doctoral

de D/D^a **SONIA APARICI GONZALO**

estudiant del programa de doctorat **3139 Medicina** (RD99/2011), de la Universitat de València, emeten informe **FAVORABLE** per a la realització del dipòsit i defensa de la tesi doctoral.

Data: 3 de Desembre de 2020

Signat:



Directora

**ESCOLA DOCTORAL
UNIVERSITAT DE VALÈNCIA**

Departamento: Departamento de Medicina

Facultad de Medicina y Odontología. Universidad de Valencia.

Programa de doctorado: 3139 Medicina

Título: PAPEL DE LA MELATONINA EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL CALOSTRO Y LECHE HUMANA MADURA. DIFERENCIAS ENTRE PARTO VAGINAL Y PARTO POR CESÁREA

Autora: Sonia Aparici Gonzalo

Directora:

Profa. Pilar Codoñer Franch

Catedrática de Pediatría

Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología

Universidad de Valencia

“Our posturings, our imagined self-importance, the delusion that we have some privileged position in the Universe, are challenged by this point of pale light.”

Pale Blue Dot

Carl Sagan

*A Mixel, Carme i Lluís, la meua familia. Gràcies per donar-me tant d'amor. Mami ja no vos
furtarà més temps.*

A las mujeres de mi vida:

*Mis abuelas, Gloria y María, por tener la fortaleza de salir adelante rodeadas de dificultades,
por cuidarnos tan bien y enseñarnos tanto. Nunca olvidaremos de dónde venimos...*

*Mi madre, por tus grandes esfuerzos por nosotros. Por creer siempre en mí. Por seguir
cuidándome cuidando de los pequeños.*

*Susana, mi amiga, mi compañera. Seguiremos contando las mismas anécdotas en las
siguientes vidas. Una y otra vez.*

AGRADECIMIENTOS

A mi directora, Pilar Codoñer Franch, gracias por hacer realidad este trabajo, por tu apoyo, por tu paciencia y por hacer tan sencillas las dificultades encontradas en este largo camino.

A Gonzalo Pin Arboledas, por tus ideas, tus iniciativas, por compartir conmigo tus conocimientos, y por tu incansable motivación y voluntad de ayuda constante.

Agradezco especialmente esta tesis, a Paloma De Miguel Aguilar, por invitarme a aprender de ti el apasionante mundo de la lactancia materna. Gracias por enseñarme tantas cosas bonitas e interesantes. Por transmitir tanta ciencia con tanto amor, tanto respeto y tanta humildad.

A todas las mujeres que aceptaron participar en este estudio con su esfuerzo.

A todo el personal de enfermería y auxiliares, que me ayudaron con su trabajo, en la recogida y almacenamiento de las muestras, altruistamente y con tanto cariño, en especial, a Belén, Rocío, Amparo y Noelia, por hacerme sentir miembro de una pequeña gran familia.

A mis compañeros pediatras, que me ayudaron en el reclutamiento de mujeres participantes durante sus guardias, especialmente a Laura Martorell, por tu incondicional compañerismo y amistad.

A Joaquín Carrasco, por tu impecable trabajo, y tu disponibilidad en cualquier momento.

A Marie Gombert, por ayudarme con tus conocimientos, especialmente en los inicios de este trabajo, justo cuando más ayuda necesité.

A Quirón Salud Instituto de Investigación e Innovación, por facilitarme la prestación de apoyo estadístico.

A Ignacio Mahillo Fernández, por proporcionarme tanta ayuda con el análisis de los datos.

A Lola Rabasco, por ser más que una jefa. Por ser tan comprensiva y facilitarme el trabajo.

A Isabel Sanz, Esther Ballester y María Del Cañizo, mis compañeras de fatigas, mis pediatras de referencia, mis maestras, mis “r3 eternas”.

GRACIAS.

Papel de la melatonina en la capacidad antioxidante del calostro y leche humana madura.

Diferencias entre parto vaginal y parto por cesárea.

RESUMEN

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

El parto es el resultado de una compleja interacción entre esteroides, agentes vasoactivos, prostaglandinas, y fenómenos inflamatorios. En las últimas décadas estamos asistiendo a un aumento de la práctica de cesáreas electivas en los países desarrollados, alcanzando tasas de cesáreas por encima de lo recomendable según la Organización Mundial de la Salud. Los fenómenos estresantes ocurridos a nivel perinatal tienen consecuencias en el recién nacido, tanto a corto como a largo plazo.

La transición fetal a la vida extrauterina es un momento clave en el que el feto pasa de un ambiente relativamente hipóxico a un ambiente oxigenado. La inmadurez de su sistema antioxidante, junto a determinadas situaciones que fomentan el desarrollo de daño oxidativo hacen que ese momento sea de gran vulnerabilidad para el establecimiento de sus consecuencias.

El parto y el periparto constituye, por tanto, un periodo de susceptibilidad frente al estrés oxidativo. El nacimiento por cesárea, además, podría ser el desencadenante para la aparición una serie de fenómenos de daño oxidativo con importante repercusión en la madre y en el recién nacido.

La leche materna es el mejor alimento para el recién nacido, no sólo por sus características nutritivas, sino por su riqueza y especificidad en productos bioactivos, capaces de provocar cambios moleculares con un gran poder beneficioso para la salud. Uno de estos componentes bioactivos es la melatonina, la principal hormona implicada en los cambios circadianos en el mundo animal, una indolamina secretada principalmente por la glándula pineal, altamente difusible y con una distribución de receptores celulares ubicua en el organismo. La melatonina alcanza sus niveles pico en el plasma durante la noche, y sus niveles mínimos son prácticamente indetectables durante el día. A parte de sus implicaciones cronobiológicas, la melatonina tiene una función fundamental como

molécula antioxidante e inmunomoduladora. Hay que tener en cuenta que los niveles de melatonina en plasma o saliva de recién nacidos son indetectables hasta los 2 meses de vida, mientras que la maduración en los ciclos de sueño/vigilia no se inicia hasta los 6 meses de vida. Por tanto, la única fuente de melatonina para el recién nacido y los primeros meses de la vida es la leche materna.

Múltiples estudios demuestran que la leche materna aporta factores antioxidantes en el periodo perinatal, sobre todo en el calostro, por lo que cumple una función primordial a esta edad.

Existe una gran heterogeneidad en los resultados de las investigaciones referentes a los cambios observados a nivel del metabolismo oxidativo en el ámbito perinatal en función del tipo de parto. Además, las investigaciones realizadas cuyo objetivo es el estudio de estos posibles cambios en la leche materna, son escasas, especialmente en lo que se refiere al conocimiento del comportamiento de la melatonina en leche materna, o de su capacidad antioxidante bajo la influencia del tipo de parto.

La hipótesis de nuestra investigación es que existen diferencias en la capacidad antioxidante de la leche materna en función del tipo de parto, y que estas diferencias están influenciadas por el contenido de melatonina en la leche materna.

OBJETIVOS

OBJETIVO PRIMARIO

Valorar si existen diferencias en el contenido de melatonina en la leche humana, así como en su capacidad antioxidante, tanto en calostro como en el resto de fases de la lactancia materna durante el primer mes tras el nacimiento, en función del tipo de parto: vaginal o cesárea no urgente.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Describir la cronología de aparición de ritmo circadiano en la secreción de melatonina en leche materna en el primer mes tras el parto.
- Validar un método de determinación de melatonina en calostro y leche materna madura.
- Determinar la capacidad antioxidante en la leche materna dependiendo del tipo de parto.
- Determinar el contenido en biomarcadores de estrés oxidativo en la leche materna dependiendo del tipo de parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional de cohortes, prospectivo, a lo largo del periodo comprendido entre enero 2016 y mayo 2017.

POBLACIÓN A ESTUDIO

La población diana del estudio fueron madres lactantes, que habían dado a luz a recién nacidos a término, sanos, alimentados con leche materna exclusivamente, sin antecedentes de patología gestacional ni perinatal

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Leche materna procedente de mujeres puérparas sanas con recién nacidos sanos, producto de partos a término, procedentes de las Salas de Maternidad del Hospital Dr. Peset de Valencia o del Hospital Quirón de Valencia.
- Debían cumplirse los siguientes criterios:
 - Recién nacidos con peso adecuado a la edad gestacional
 - Antecedente de parto vía parto vaginal o cesárea electiva
 - Recién nacidos alimentados exclusivamente con lactancia materna
 - Mujeres que acepten participar firmando el consentimiento informado

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Partos mediante cesárea urgente
- Partos a edad gestacional menor de 37 semanas
- Recién nacidos con peso al nacimiento inferior a 2500 gramos
- Apgar <5 a los 5 minutos o pH de calota < 7,10 o exploración neurológica patológica las primeras 8 horas de vida
- Administración de FiO₂ > 21% al recién nacido en cualquier momento desde el nacimiento

- Sospecha prenatal de retraso del crecimiento intrauterino según criterios estadísticos de normalidad para las curvas poblacionales específicas y/o alteraciones en el estudio Doppler de la arteria umbilical o circulación fetal
- Cualquier estado hipertensivo del embarazo según criterios estandarizados
- Diabetes gestacional
- Tabaquismo
- Antecedente de infección bacteriana en el tercer trimestre
- Madres con antecedente de trastorno del sueño durante la gestación, según criterios diagnósticos estandarizados
- Madres que hayan ejercido su actividad laboral durante la franja horaria nocturna en el tercer trimestre, o estén ejerciendo dicho tipo de trabajo tras el parto
- Patología neonatal tipo distrés respiratorio y/o sepsis en las primeras 24 horas de vida
- Administración de cualquier suplemento alimentario que no sea leche materna
- Tratamiento materno con fármacos antidepresivos, antipsicóticos, hormona tiroidea o antiinflamatorios esteroideos
- Domicilio habitual sito a una distancia mayor de 10 km de diámetro del Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Pediatría de la Universidad de Valencia.

VARIABLES

La recogida de datos se realizó una vez aceptadas las condiciones del estudio y firmado el consentimiento correspondiente.

Las variables que se recogieron fueron:

- Variables perinatales:
 - Edad materna en el momento del parto
 - Edad gestacional en el momento del parto

- Tipo de parto, distinguiendo si se trata de parto vaginal o cesárea no urgente
- Peso al nacimiento
- pH de arteria umbilical
- Variables en leche materna:
 - Parámetros analíticos de inflamación (IL6, TNF α , IFN γ)
 - Parámetros analíticos de estrés oxidativo mediante la determinación de productos de estrés oxidativo a proteínas o determinación de grupos carbonilo.
 - Parámetros analíticos para determinar la capacidad antioxidante de la leche materna
 - Contenido de melatonina en la leche materna

RECOGIDA Y ALMACENAMIENTO DE MUESTRAS DE LECHE MATERNA

El estudio recogió datos durante el primer mes tras el parto.

La recogida de muestras se realizó como se describe a continuación:

- Se recogieron 2 muestras por sujeto de estudio los días 1, 3 y 30 post-parto, en dos momentos del día para cada mujer (entre las 12 y 2 p.m. para las muestras diurnas, y las 12 y 2 a.m. para las muestras nocturnas), por lo que se recogieron 6 muestras en total por cada mujer participante.
- Las muestras se recogieron mediante masaje manual o sacaleches eléctrico y bajo estrictas condiciones de higiene. Se conservaron en congelador a -20°C un máximo de 48 horas previo a su traslado, manteniendo las condiciones de frío, hasta el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Pediatría y Obstetricia de la Universidad de Valencia, donde se almacenaron congeladas a -80°C. Todas las muestras nocturnas se recogieron en condiciones de luz tenue amarillenta, a una

distancia mínima de 2 metros del foco de luz, y se almacenaron en recipientes cubiertos con papel opaco hasta su procesamiento final.

- Análisis bioquímico de las variables principales en leche materna:
 - Melatonina, mediante el método ELISA, DRGMelatonin ELISA-EIA-1431; DRG International, Inc., Springfield, NJ, USA; expresado en pg/mL
 - Interleucina 6 (IL6), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), Interferón Gamma (IFN γ), expresado en pg/mL. Luminex Map Technology LabScan 100 system (Luminex Austin TX USA) y Milliplex MAP human high sensitivity T cell panel-immunology multiplex assay catalog number HSTCMAG-28 SK para TNF- α , IL-6 INF- γ (Merck Millipore, Burlington MA, USA).
 - Daño oxidativo a proteínas, mediante la determinación de grupos carbonilo, según el método descrito por Levine et al, expresado en nmol/mg de proteína.
 - Capacidad antioxidante total, expresado en mmol equivalentes de Trolox Método descrito por Brand-Williams modificado por Gombert et al 2018 mediante 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó una probabilidad (p) < 0,05 para definir significancia estadística.

Se utilizaron herramientas estadísticas mediante pruebas no paramétricas debido a la distribución asimétrica.

Se realizaron varios tipos de análisis:

1. Descripción y comparación entre medianas de las variables principales según tipo de parto.

La descripción de los datos se realizó con la mediana y los cuartiles inferior y superior (percentiles del 25% y del 75%). Las comparaciones se realizan con el test de la suma de rangos de Wilcoxon.

2. Cambios de las variables en los días 3 y 30 respecto al primer día.

Con el objetivo de encontrar si alguna de las variables estudiadas evolucionó de un modo distinto según el tipo de parto a lo largo del mes de vida, se observó la evolución que experimenta cada variable al día 3 y al día 30 respecto al día 1. Estas evoluciones o cambios se midieron distinguiendo entre las mediciones tomadas por el día y las tomadas por la noche. La descripción se realizó con la mediana y los cuartiles. Se realizaron dos tipos de comparaciones: las comparaciones intra-grupos y las comparaciones entre grupos. Estas comparaciones se realizaron con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

3. Cambios de las variables a lo largo del día.

Se analizaron los cambios que experimentó cada variable a lo largo del día (día versus noche). Estos cambios se midieron por separado para el día 1, 3 y 30. Se realizaron dos tipos de comparaciones: las comparaciones intra-grupos y las comparaciones entre grupos. La descripción se realizó con la mediana y cuartiles. Estas comparaciones se realizaron con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon

4. Correlaciones con los valores de melatonina.

Finalmente, se calcularon las correlaciones de Spearman entre la melatonina y cada una de las variables con el objetivo de estudiar el tipo de asociación existente. Las correlaciones se calcularon para cada momento de lactancia, momento del día y tipo de parto. Se estudiaron también las correlaciones entre las variaciones que presentaron los valores de melatonina y el resto de variables desde el primer día, al día 3 y 30, así como las variaciones a lo largo del día (entre el día y la noche). Dado que se trata de muestras pequeñas, las correlaciones con valores de R fuertes o muy fuertes se consideran válidas, a pesar de los valores de p respectivos no sean $p < 0.05$.

RESULTADOS

○ **Características generales**

Se analizaron 126 muestras de leche materna procedentes de 21 mujeres que parieron vía vaginal, y 102 muestras de leche materna procedentes de 17 mujeres que parieron por cesárea electiva. No se encontraron diferencias en las características generales de las mujeres participantes entre ambos grupos.

○ **Descripción y comparación de las medianas de las variables principales según el tipo de parto.**

- *Marcadores inflamatorios.* Existe mayor contenido en los parámetros inflamatorios en las muestras diurnas de calostro y leche de transición en el grupo de cesáreas, sobre todo IL6 y el TNF- α , sin ser significativas.
- *Metabolismo oxidativo.*
 - *Daño oxidativo a proteínas: grupos carbonilo.* Mayor contenido en grupos carbonilo en la leche materna madura nocturna procedente de mujeres tras parto por cesárea (7040 nmol/mg de proteína versus 4620 nmol/mg de proteína; $p = 0,029$).

- *Capacidad antioxidante de la leche materna:* Mayor contenido en DPPH en el calostro diurno de mujeres que parieron por cesárea, con niveles cercanos a la significación estadística (344 mmol equivalentes de Trolox versus 152 mmol equivalentes de Trolox; $p = 0,053$). Mayor contenido en DPPH en la leche de transición diurna de las mujeres que parieron vía vaginal (270 mmol equivalentes de Trolox versus 187 mmol equivalentes de Trolox; $p = 0,037$)
- Melatonina. Mayor contenido en melatonina en el calostro diurno del grupo de cesáreas (30,3 pg/mL versus 14,7 pg/mL; $p = 0,020$)
- **Cambios de las variables estudiadas en leche materna en los días 3 y 30 respecto al primer día.**
- *Marcadores inflamatorios.* Existe progresión descendiente en el contenido de algunos marcadores inflamatorios (IL 6 y TNF α) a lo largo de la lactancia durante el primer mes en los partos por cesárea, sin ser significativo.
- *Metabolismo oxidativo.*
 - *Daño oxidativo a proteínas: grupos carbonilo.* Existe un descenso estadísticamente significativo en las muestras de leche madura diurna respecto al del calostro, en el grupo de partos vaginales, lo cual no sucede en el grupo de cesáreas ($p = 0,034$).
 - *Capacidad antioxidante de la leche materna.* Existe un descenso en la capacidad antioxidante de la leche de transición diurna procedente de mujeres tras el parto por cesárea respecto al del contenido en el calostro. Las comparaciones entre grupos (vaginal versus cesárea), muestran evoluciones significativamente opuestas en la leche de transición diurna: existe un aumento de la misma cuando se trata de partos vaginales, y un descenso en el caso de leche procedente de mujeres tras parto por cesárea ($p = 0,009$).

- **Melatonina.** Se observa un descenso significativo en el contenido de melatonina diurna al día 30 respecto al día 1 en el grupo de parto vaginal ($p = 0,001$). En el grupo de cesáreas, el contenido en melatonina experimenta un descenso estadísticamente significativo desde el primer al tercer día, tanto en las muestras diurnas como en las nocturnas ($p = 0,016$ y $p = 0,048$ respectivamente).
- **Cambios de las variables en la leche materna de la noche respecto al día.**
- Mayor contenido en melatonina en leche materna nocturna respecto a la diurna, de forma estadísticamente significativa en todas las fases de la lactancia independientemente del tipo de parto ($p < 0.05$). No hay diferencias en función del tipo de parto.
- **Correlaciones con los valores de melatonina.**
- Correlaciones entre melatonina y el resto de variables:
 - Parto vaginal: no se observan correlaciones entre melatonina y los parámetros de estrés oxidativo en calostro ni en la leche de transición. Se observa correlación negativa moderada entre la melatonina y el contenido en grupos carbonilo en la leche materna madura diurna ($R = -0,53$).
 - Parto por cesárea: se observa correlación positiva entre melatonina y grupos carbonilo, así como entre melatonina y DPPH en el calostro diurno ($R = 0,50$ y $R = 0,70$, respectivamente). Correlación negativa entre el contenido en melatonina y los grupos carbonilo en calostro nocturno ($R = -0,66$).

- **Correlación entre la forma en la que evoluciona el contenido de melatonina y la evolución experimentada por el resto de variables desde el primer día.**
- Parto vaginal: Correlación negativa entre la variación en el contenido de melatonina y el de grupos carbonilo en la leche madura nocturna respecto al del calostro (R = -0,80).
- Parto por cesárea: Correlación positiva entre la evolución de los parámetros inflamatorios en leche materna nocturna respecto al contenido en melatonina al día 3 y día 30 desde el primer día (TNF- α , R = 0,66 y R = 0,67; IFN γ , R = 0,63 y R = 0,69). Correlación positiva entre la evolución que experimenta en la leche materna diurna el contenido en melatonina y la de la capacidad antioxidante al día 30 respecto al primer día (R = 0,85).

CONCLUSIONES

- I. El contenido en melatonina diurna en leche materna tras la práctica de una cesárea es significativamente mayor en las primeras 24 horas, al compararla con la de la leche materna tras un parto vaginal.
- II. Existe ritmicidad en el contenido de melatonina en leche materna a lo largo del día, en condiciones de ausencia de patología e independiente al tipo de parto.
- III. El método utilizado para la determinación del contenido en melatonina en la leche materna en cualquiera de las tres fases estudiadas, tanto en su forma de recogida y almacenamiento, como su procesamiento y determinación a nivel bioquímico demuestra validez y fiabilidad, debido al paralelismo en el ritmo circadiano objetivado con el descrito en el plasma.
- IV. En los primeros días tras el parto, la capacidad antioxidante de la leche materna de transición diurna tras el parto por cesárea es significativamente menor que la procedente de mujeres tras parto vaginal, en ese mismo momento de la lactancia.

- V. La forma en la que evoluciona la capacidad antioxidante de la leche materna en los primeros días es significativamente diferente dependiendo del tipo de parto: se observa un descenso de la misma al tercer día tras el parto por cesárea; mientras que un aumento significativo si se trata de parto vaginal, lo que podría corresponder a un mayor consumo antioxidante los primeros días tras la cesárea.
- VI. La leche materna procedente de madres tras un parto por cesárea presenta mayor contenido tanto en parámetros inflamatorios como en parámetros de estrés oxidativo de forma precoz en las muestras de calostro diurno en las primeras 24 horas tras la cesárea, lo cual podría ser reflejo del daño secundario al procedimiento quirúrgico.
- VII. Los parámetros de estrés oxidativo en la leche materna disminuyen a lo largo del primer mes, sin diferencias en esta forma de evolucionar entre ambos grupos, pero este descenso resulta significativo en las muestras de leche madura diurna respecto al del calostro, en el grupo de partos vaginales.
- VIII. A pesar de que el daño oxidativo va desapareciendo durante el primer mes, éste permanece significativamente más alto en la leche materna madura nocturna si el parto fue por cesárea.
- IX. Globalmente, existe un descenso en melatonina a lo largo del primer mes de lactancia. Este descenso en melatonina va en paralelo al descenso en los parámetros de estrés oxidativo e inflamación, tras el antecedente de parto por cesárea.
- X. Respecto a las asociaciones encontradas, se observa asociación moderada entre el contenido en melatonina y el de estrés oxidativo en el calostro diurno tras el parto por cesárea, mientras que esta asociación se invierte en el calostro nocturno, lo que podría corresponder a un papel de “limpieza” antioxidante por parte de la melatonina del calostro diurno en este grupo.

- XI. Además, esta hipótesis cobra fuerza al encontrar una asociación fuerte entre el contenido en melatonina y la capacidad antioxidante del calostro materno diurno tras el parto por cesárea, asociación paralela o positiva que se observa también en la forma en la que evolucionan la melatonina y la capacidad antioxidante de la leche materna desde el primer al día treinta tras el parto por cesárea.

CONCLUSIÓN FINAL

En los partos por cesárea, existe un aumento en la melatonina del calostro materno durante el día. Posteriormente, existe un descenso paralelo en el contenido en melatonina y el de productos de estrés oxidativo en la leche materna diurna a lo del primer mes.

El mayor contenido en melatonina en leche materna se asocia a un incremento en la capacidad antioxidante de la leche materna, así como a un descenso en los productos de estrés oxidativo.

**PAPEL DE LA MELATONINA EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DEL CALOSTRO Y
LECHE HUMANA MADURA. DIFERENCIAS ENTRE PARTO VAGINAL Y PARTO POR
CESÁREA**

ÍNDICE

SÍMBOLOS.....	40
1. INTRODUCCIÓN	44
1.1 Estrés oxidativo.....	44
1.1.1. Radicales libres. Especies reactivas de oxígeno.	45
1.1.2. Tipos de radicales libres.....	46
A. Anión superóxido.....	46
B. Peróxido de hidrógeno.....	47
C. Radical hidroxilo.....	47
1.1.3. Defensa antioxidante	48
1.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos.....	48
A. Superóxido dismutasa (SOD).....	49
B. Catalasa.....	49
C. Glutation peroxidasa (GPx).....	49
1.1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos exógenos.....	51
A. Vitamina C	51
B. Vitamina E	51
C. Carotenoides.....	51
D. Polifenoles.....	52
1.1.3.3. Antioxidantes no enzimáticos endógenos.....	53
A. Glutation.....	53
B. Ácido úrico	53
C. Bilirrubina	54
D. Proteínas fijadoras de metales.....	54
E. Melatonina.....	54

1.1.3.4 Consecuencias moleculares del estrés oxidativo	60
A. Daño sobre el DNA.....	60
B. Daño sobre proteínas	61
C. Daño sobre lípidos	61
D. Daño sobre carbohidratos.....	61
1.1.4. Maduración del sistema antioxidante.....	62
1.1.5. Papel del estrés oxidativo en la patogenia de enfermedades en perinatología .64	
1.1.5.1. Reanimación neonatal.....	64
1.1.5.2. Isquemia-reperfusión neonatal	64
1.1.5.3. Estrés oxidativo e inflamación	65
1.1.5.4. Enfermedades propias de la prematuridad.....	65
1.2. El parto normal	66
1.2.1. Mecanismos inflamatorios implicados en el parto.....	66
1.2.2. Estrés oxidativo en el parto	67
1.3. Parto por cesárea	69
1.3.1. Epidemiología.....	69
1.3.2. Respuesta inflamatoria en el parto por cesárea.....	70
1.3.3. Estrés oxidativo en el parto por cesárea	71
1.4. Lactancia materna.....	74
1.4.1. Aspectos nutricionales de la leche materna.....	74
1.4.2. Componentes bioactivos de la leche materna.....	75
1.4.2.1. Antioxidantes en la leche materna	77
1.4.2.2. Melatonina en la leche materna.....	78
2. JUSTIFICACIÓN.....	82
3. HIPÓTESIS	86

4. OBJETIVOS.....	90
4. 1. OBJETIVO PRIMARIO.....	90
4. 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	90
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	94
5.1. TIPO DE ESTUDIO.....	94
5.2. POBLACIÓN A ESTUDIO.....	94
5.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN.....	94
5.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	94
5.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	94
5.4. TAMAÑO MUESTRAL.....	96
5.5. VARIABLES.....	97
5.5.1. VARIABLES PRINCIPALES.....	97
5.5.2. VARIABLES SECUNDARIAS.....	98
5.6. METODOLOGÍA.....	99
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	101
6. RESULTADOS.....	106
6.9.1. Descripción y comparación de las medianas de las variables principales según el tipo de parto.	107
6.9.2. Cambios de las variables estudiadas en leche materna en los días 3 y 30 respecto al primer día.	117
6.9.3. Cambios de todas las variables en la leche materna de la noche respecto al día.....	125
6.9.4. Correlaciones con los valores de melatonina.	128
7. COMENTARIOS DE LOS RESULTADOS.....	140

8.CONCLUSIONES	154
9.BIBLIOGRAFÍA.....	160

Índice de tablas

TABLA 1. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MUJERES PARTICIPANTES (EDAD MATERNA, ÍNDICE DE MASA CORPORAL, EDAD GESTACIONAL, PESO AL NACIMIENTO, PH DE ARTERIA UMBILICAL)	106
TABLA 2. COMPARACIÓN DEL CONTENIDO EN IL6, TNF- A E IFNF EN LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA. DÍA Y NOCHE.	108
TABLA 3. COMPARACIÓN DEL ESTUDIO DEL METABOLISMO OXIDATIVO EN LECHE MATERNA (CONTENIDO EN GRUPOS CARBONILO Y DPPH) EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA. DÍA Y NOCHE.....	112
TABLA 4. COMPARACIÓN DEL CONTENIDO EN MELATONINA EN LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA. DÍA Y NOCHE.....	115
TABLA 5. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN QUE EXPERIMENTA EL CONTENIDO EN IL-6, TNF-A E IFNF EN LA LECHE MATERNA DEL TERCER Y TREINTA DÍAS TRAS EL PARTO, RESPECTO AL DEL CALOSTRO, EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA. DÍA Y NOCHE.....	118
TABLA 6. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN QUE EXPERIMENTA EL METABOLISMO OXIDATIVO (CONTENIDO EN CARBONILOS Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE) EN LA LECHE MATERNA DEL TERCER Y TREINTA DÍA TRAS EL PARTO, RESPECTO AL DEL CALOSTRO, EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA. DÍA Y NOCHE.	120
TABLA 7. COMPARACIÓN DE LA EVOLUCIÓN QUE EXPERIMENTA EL CONTENIDO EN MELATONINA EN LA LECHE MATERNA DEL TERCER Y TREINTA DÍA TRAS EL PARTO, RESPECTO AL DEL CALOSTRO, EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA.....	122
TABLA 8. CAMBIOS EN EL CONTENIDO EN IL6, TNF- A, GRUPOS CARBONILO, DPPH Y MELATONINA EN LA LECHE MATERNA EN EL DÍA Y LA NOCHE, Y EN CADA MOMENTO DE LA LACTANCIA. DIFERENCIAS EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO.....	126
TABLA 9. CORRELACIÓN DEL CONTENIDO DE CADA UNA DE LAS VARIABLES INFLAMATORIAS (IL6, TNF- A E IFNF) EN LECHE MATERNA RESPECTO AL DE MELATONINA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO, DEL MOMENTO DEL DÍA Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA.....	129

TABLA 10. CORRELACIÓN DEL CONTENIDO EN PRODUCTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO (GRUPOS CARBONILO) EN LECHE MATERNA Y DEL CONTENIDO ANTIOXIDANTE DE LA LECHE MATERNA, RESPECTO AL DE MELATONINA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO, DEL MOMENTO DEL DÍA Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA.	130
TABLA 11. CORRELACIÓN DE LA FORMA EN QUE EVOLUCIONAN LAS VARIABLES INFLAMATORIAS (IL6, TNF- A E IFN γ) EN LECHE MATERNA RESPECTO A LA DE LA MELATONINA AL TERCER Y TREINTA DÍA TRAS EL PARTO DESDE EL PRIMER DÍA, EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO, DEL MOMENTO DEL DÍA Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA.	135
TABLA 12. CORRELACIÓN DE LA FORMA EN QUE EVOLUCIONAN LOS PRODUCTOS DE ESTRÉS OXIDATIVO (GRUPOS CARBONILO), Y LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE LA LECHE MATERNA, RESPECTO A LA DE LA MELATONINA AL TERCER Y TREINTA DÍA TRAS EL PARTO DESDE EL PRIMER DÍA, EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO, DEL MOMENTO DEL DÍA Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA.	136

Índice de Figuras

FIGURA 1. REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE LA SÍNTESIS DE MELATONINA EN EL PINEALOCITO..	56
FIGURA 2. GRÁFICA DE CAJAS Y BIGOTES PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DE IL-6 EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA (CALOSTRO, LECHE DE TRANSICIÓN Y LECHE MADURA). DÍA Y NOCHE.....	109
FIGURA 3. GRÁFICA DE CAJAS Y BIGOTES PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO DE TNF- A EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA (CALOSTRO, LECHE DE TRANSICIÓN Y LECHE MADURA). DÍA Y NOCHE.....	110
FIGURA 4.. GRÁFICA DE CAJAS Y BIGOTES PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN EL CONTENIDO EN GRUPOS CARBONILO EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA (CALOSTRO, LECHE DE TRANSICIÓN Y LECHE MADURA). DÍA Y NOCHE.	113
FIGURA 5. GRÁFICA DE CAJAS Y BIGOTES PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE LAS DIFERENCIAS EN LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LA LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA (CALOSTRO, LECHE DE TRANSICIÓN Y LECHE MADURA). DÍA Y NOCHE.....	114
FIGURA 6. GRÁFICA DE CAJAS Y BIGOTES PARA LA REPRESENTACIÓN DE LA COMPARACIÓN DE LAS DIFERENCIAS CONTENIDO DE MELATONINA EN LA LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO Y DEL MOMENTO DE LACTANCIA (CALOSTRO, LECHE DE TRANSICIÓN Y LECHE MADURA). DÍA Y NOCHE.....	116
FIGURA 7. REPRESENTACIÓN CONJUNTA DE LA EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN MELATONINA (PG/ML) Y DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE EN LECHE MATERNA (EXPRESADO EN MMOL X 10) EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO, A LO LARGO DEL PRIMER MES DE LACTANCIA..	123
FIGURA 8. REPRESENTACIÓN CONJUNTA DE LA EVOLUCIÓN EN EL CONTENIDO EN MELATONINA (PG/ML) Y GRUPOS CARBONILO (EXPRESADO EN NMOL/MG X 100) EN LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO A LO LARGO DEL PRIMER MES DE LACTANCIA.....	124

FIGURA 9. CAMBIOS EN EL CONTENIDO DE MELATONINA EN LA LECHE MATERNA EN LAS DIFERENTES FASES DE LA LACTANCIA, DURANTE EL DÍA Y LA NOCHE, EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO	127
FIGURA 10. GRÁFICAS DE DISPERSIÓN PARA LAS CORRELACIONES DEL METABOLISMO OXIDATIVO CON EL CONTENIDO DE MELATONINA	131
FIGURA 11. GRÁFICO DE DISPERSIÓN PARA LAS CORRELACIONES ENTRE MELATONINA Y GRUPOS CARBONILO.....	131
FIGURA 12 . GRÁFICO DE DISPERSIÓN PARA LAS CORRELACIONES ENTRE MELATONINA Y CAPACIDAD ANTIOXIDANTE.....	132
FIGURA 13. GRÁFICAS DE DISPERSIÓN PARA LA CORRELACIÓN ENTRE LA EVOLUCIÓN QUE EXPERIMENTA LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y EL CONTENIDO EN MELATONINA EN LECHE MATERNA A LO LARGO DEL PRIMER MES DE LACTANCIA	137

SÍMBOLOS

ADP: Adenosín Difosfato

ATP: Adenosín Trifosfato

CAT: Capacidad Antioxidante Total

CAT: Catalasa

Cu-Zn-SOD: Cobre-Zinc- Superóxido dismutasa

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DPPH: 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo

EGF: Factor de Crecimiento Epidérmico

ELISA: Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas

Fe +2: Ion ferroso

Fe +3: Ion férrico

G-CSF: Factor Estimulante de Colonias Granulocíticas

GPx: Glutation Peroxidasa

GSH: Glutation Reducido

GSSG: Glutation Oxidado

H₂O: Agua

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HMOS: Oligosacáridos de Leche Humana

IFN γ : Interferón gamma

IgA: Inmunoglobulina A

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

IL-1: Interleucina 1

IL-10: Interleucina 10

IL-6: Interleucina 6

IL-8: Interleucina 8

MDA: Malondialdehído

Mn-SOD: Manganese- Superóxido dismutasa

NADP+: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma Oxidada

NADPH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato en su forma Reducida

NGF: Factor de Crecimiento Nervioso

O₂: Oxígeno

O₂•-: Oxígeno singlete

OH⁻: Anión hidróxido

OH•: Radical hidroxilo

ROS: Especies reactivas de oxígeno

SOD: Superóxido dismutasa

SOD1: Superóxido dismutasa tipo 1

SOD2: Superóxido dismutasa tipo 2

SOD3: Superóxido dismutasa tipo 3

TMB: 3,3',5,5' Tetrametilbenzidina

TNF- α: Factor de Necrosis Tumoral Alpha

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés oxidativo

Desde el origen de la Tierra, hace unos 4500 millones de años, el contenido en oxígeno de la atmósfera ha experimentado aumentos significativos, hasta la era actual. Hasta hace unos 2500 millones de años, el contenido atmosférico y oceánico de oxígeno era prácticamente inexistente, siendo la vida de los primeros organismos unicelulares predominantemente anaeróbica(1). El primer gran aumento en el contenido atmosférico de oxígeno se produce gracias a la aparición de las primeras cianobacterias, que, mediante la fotosíntesis, provocan un aumento importante de la concentración de oxígeno de la atmósfera. Se trata de la Gran Oxidación(2). Este fenómeno, por un lado permite la iniciación a una nueva forma de vida aeróbica, más compleja, donde el rendimiento energético obtenido vía respiración aeróbica es mucho mayor que los antecesores (2,3). Por otro lado, el aumento del contenido de oxígeno atmosférico provoca la gran extinción en masa de los organismos anaeróbicos predominantes hasta el momento. Es por esto, que la molécula de oxígeno presenta una dualidad funcional, por una parte, necesaria para la vida actual, pero por otra parte, tóxica y precursora de los fenómenos de muerte celular. Por ello, las células han ido adquiriendo mecanismos de defensa antioxidante, que compensen el daño potencial secundario al propio metabolismo aeróbico (4).

Una alteración en el balance oxidativo/defensa antioxidante, provoca una situación de estrés oxidativo con el consecuente daño molecular y celular(5).

La adaptación del ser humano a la vida en un ambiente óptimo de oxígeno es compleja, especialmente en el periodo neonatal, donde existe un brusco incremento en la disponibilidad del oxígeno en el ambiente, en comparación al ambiente hipoxémico intraútero. También durante el propio proceso de parto normal, el feto sigue

manteniendo de forma estable una saturación de oxígeno baja en comparación a la saturación de oxígeno en la vida extrauterina humana, reflejo del ambiente hipoxémico intraútero (6). Por todo ello, junto a la inmadurez de los sistemas de defensa antioxidante al nacimiento, la época perinatal es un periodo de gran vulnerabilidad al daño oxidativo, tanto a nivel molecular, como a nivel epigenético, por lo que las alteraciones en cualquier factor implicado en el equilibrio del metabolismo oxidativo, podría resultar en situaciones patológicas a largo plazo(7).

1.1.1. Radicales libres. Especies reactivas de oxígeno.

Todos los átomos están compuestos por un núcleo, formado por protones y neutrones, y una corteza de electrones que se mueven alrededor del núcleo, dentro de orbitales. Los electrones tienen distintos niveles energéticos y dependiendo de ellos, se distribuyen en un tipo de orbital u otro. En cada orbital puede haber hasta dos electrones girando sobre su propio eje, lo que genera energía magnética. Si en un orbital se encuentran dos electrones apareados, sus sentidos de giro son opuestos, anulándose de esta manera la energía magnética generada por cada uno de ellos al girar, pasando este átomo a llamarse diamagnético. Los electrones tienden a asociarse con otro electrón, de forma que aparean sus sentidos de rotación en un sistema de baja energía.

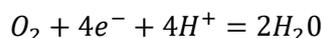
Un radical libre, o especie reactiva de oxígeno (ROS), se define como cualquier especie química capaz de una existencia independiente y que contiene uno o más electrones no apareados (8).

Los radicales libres pueden reaccionar con otras moléculas de forma diversa. Así un ROS, puede donar su electrón no apareado a otra molécula (reductora), o recibir otro electrón de otra molécula (oxidante). Estas reacciones convierten a la molécula con la que reaccionan en radical libre a su vez, generando reacciones de formación de radicales libres en cadena.

Las principales fuentes de producción de radicales libres de oxígeno son(9):

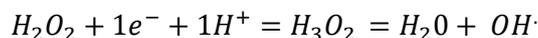
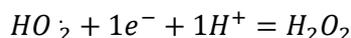
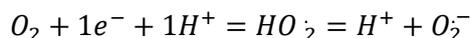
- La cadena de transporte electrónico, en la mitocondria
- Vías enzimáticas no mitocondriales, como la reacción de Fenton, el complejo citocromo P450 oxidasa o la familia de NADPH oxidasas
- La acción de las células inflamatorias
- La betaoxidación peroxisomal

En los organismos vivos, bajo condiciones aeróbicas, más del 90% del oxígeno consumido es reducido a agua.



Menos del 10% del oxígeno consumido es transformado en ROS vía reacciones de reducción univalente seriadas. Tras la primera reacción de reducción univalente del oxígeno molecular, este se convierte en anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). A su vez, con la aceptación concomitante de dos protones, junto a otro electrón por parte del anión superóxido, se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que a su vez, tras la aceptación de un electrón más, se divide en radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y anión hidroxilo (OH^-)

Finalmente, el radical hidroxilo interactúa con un electrón y un protón más resultando en la formación de la molécula de agua (10).



1.1.2. Tipos de radicales libres

A. Anión superóxido.

El anión superóxido es considerado el radical libre “primario”. Es escasamente reactivo per se, pero puede interactuar con otras moléculas para producir “especies

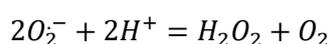
reactivas secundarias". Puede actuar tanto como agente reductor produciendo oxígeno molecular ($X + O_2^- + 1H^+ = XH + O_2$), como agente oxidante dando como resultado peróxido de hidrógeno ($YH + O_2^- + 1H^+ + O_2 = Y \cdot + H_2O_2$).

La principal fuente de producción del anión superóxido es la cadena respiratoria localizada en la membrana interna de la mitocondria, sobretodo a partir de los complejos I, II y III (11,12). Además de la cadena respiratoria, existen múltiples enzimas pro-oxidantes que pueden producir anión superóxido, como la xantina oxidasa, vía transformación de hipoxantina en ácido úrico (13), o la oxidasa (NADPH oxidasa, propia de células epiteliales, músculo liso o endotelio vascular) (14).

B. Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno no es un radical libre per se, pero es químicamente activo, y en presencia de iones como el hierro o el cobre, forma especies mucho más reactivas, como el radical hidroxilo (8,15)

Por un lado, se origina a partir de la dismutación del O_2^- en H_2O_2 gracias a la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD), presente en la matriz mitocondrial (más concretamente la forma manganeso-superóxido-dismutasa)(16).

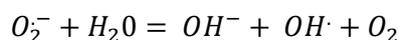


Otra fuente de producción de H_2O_2 son los peroxisomas bajo condiciones fisiológicas (16).

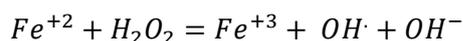
C. Radical hidroxilo

El radical hidroxilo es el más reactivo y peligroso para la célula. Su vida media in vivo es muy corta, $\sim 10^{-9}$ segundos(17), por lo que reacciona en la vecindad de su lugar de producción (13,18). Su formación depende fundamentalmente de dos procesos bioquímicos:

1. Reacción de Haber-Weiss, a partir de un exceso de producción de $O_2^{\cdot-}$ y de H_2O_2 (19)



2. Reacción de Fenton (20). A partir de metales de como el hierro o el cobre(15).



1.1.3. Defensa antioxidante

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a bajas concentraciones en comparación con la de un sustrato oxidable, retrasa o inhibe significativamente la oxidación de ese sustrato(21). Sin embargo, a esta clásica definición hay que añadirle determinados matices o condicionantes de los que depende el adecuado control del daño provocado por los radicales libres, como son la reactividad de los antioxidantes frente al radical libre; el número de moléculas de radical libre neutralizadas por cada molécula antioxidante; la liposolubilidad del antioxidante y la presencia de reacciones secundarias (22).

La protección celular frente al daño oxidativo puede ser vía mecanismos preventivos de la formación de radicales libres, vía intercepción de los productos prooxidantes, o bien vía reparación del daño(23,24). Por lo que nos ocupa, a continuación se describen los principales sistemas involucrados en la protección antioxidante vía prevención o intercepción de productos prooxidantes, conceptos que en la práctica, son solapables.

Desde un punto de vista bioquímico, los antioxidantes pueden clasificarse en enzimáticos o no enzimáticos.

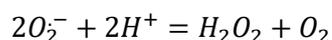
1.1.3.1. Antioxidantes enzimáticos

Se han denominado también como antioxidantes de “primera línea de defensa”, (25). Todo el pool de enzimas antioxidantes evita la formación del radical hidroxilo

mediante la eliminación de sus metabolitos predecesores, el $O_2^{\bullet-}$ y el H_2O_2 . De esta forma, el sistema enzimático antioxidante previene de forma eficiente la formación del OH^{\bullet} , aunque existen pequeñas cantidades que se escapan a esta protección, y que son responsables del daño celular(10).

A. Superóxido dismutasa (SOD)

Las superóxido dismutasas son un grupo de enzimas que convierten el anión radical $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 (como se ha explicado anteriormente):



Existen tres tipos de superóxido dismutasa en humanos:

- SOD1 o Cu-Zn-SOD: presente en el citoplasma; que contiene cobre y zinc
- SOD2 o Mn-SOD: presente en la matriz mitocondrial: que contiene manganeso
- SOD3 o Cu-Zn-SOD: presente a nivel extracelular; que contiene cobre y zinc

B. Catalasa

La catalasa es responsable de la detoxificación del H_2O_2 en H_2O y O_2 .

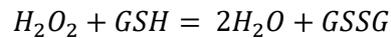


La catalasa es muy abundante en los mamíferos. Se localiza en los peroxisomas, sobretodo en hepatocitos y eritrocitos (26), y se encarga de catalizar el H_2O_2 generado por las oxidasas.

C. Glutation peroxidasa (GPx)

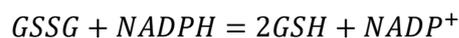
La familia de enzimas glutatión peroxidasa (GPx) es la más importante defensa antioxidante mitocondrial (8,12). Son enzimas que contienen selenio, y eliminan el H_2O_2 al acoplar su reducción al agua con la oxidación del glutatión reducido (GSH), utilizado

como donante de electrones (12). Como consecuencia, se genera sulfuro de glutatión, o glutatión en su forma oxidada (GSSG).



Se han descrito cuatro isoformas de glutatión peroxidasa, siendo fundamentalmente las GPx1 y GPx4 las que juegan un papel más importante en la defensa antioxidante. La GPx1 es la forma predominante, localizada sobretodo en el citosol. La GPx4, de localización citosólica o mitocondrial, reduce los hidroperóxidos de los ácidos grasos esterificados en los lípidos de las membranas o las lipoproteínas, y el H₂O₂ a expensas del GSH, lo que la convierte en la primera línea de defensa antioxidante de las membranas celulares (8,12).

Para evitar la depleción intracelular del glutatión, otra enzima, la glutatión reductasa, se encarga de reducir de nuevo, el glutatión oxidado gracias al NADPH (que a su vez se mantiene gracias a múltiples reacciones de reducción del NADP⁺, donde están implicadas enzimas como la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, o la 6-fosfogluconato-deshidrogenasa) (10):



1.1.3.2. Antioxidantes no enzimáticos exógenos

A. Vitamina C

La vitamina C o ácido ascórbico es una vitamina hidrosoluble. Se considera uno de los más potentes antioxidantes no enzimáticos. Su fuente en el ser humano es externa, no se sintetiza ni se acumula por largos periodos, por lo que su administración diaria mediante la dieta es muy importante (27).

La vitamina C elimina radicales hidroxilo, peróxido de hidrógeno y superóxido, formando ácido dehidroascórbico(25). Aunque el ácido ascórbico no es un eliminador directo de radicales lipófilos, tiene un efecto sinérgico en combinación con tocoferol, en la eliminación de radicales de la peroxidación lipídica(24,25).

El principal problema del ácido ascórbico es su papel también prooxidante que ha demostrado en presencia de hierro o cobre, propiciando la formación de radicales hidroxilo o iniciando la peroxidación lipídica(25,27).

B. Vitamina E

La vitamina E incluye una serie de compuestos (tocoferoles y tocotrienoles) con alta capacidad en la inhibición de la peroxidación lipídica, por lo que cumple una función esencial en la protección de las membranas frente al daño de los radicales libres(25,28). Dado que la vitamina E solo es sintetizada por las plantas, es un nutriente dietético muy importante. Su actividad antioxidante consiste principalmente en su capacidad de donar sus hidrógenos fenólicos a radicales libres de lípidos.

C. Carotenoides

Los carotenos son moléculas de síntesis vegetal, ampliamente distribuidas en la naturaleza, especialmente en las frutas y vegetales muy pigmentadas.

La mayoría de los 600 carotenoides que se encuentran en la naturaleza tienen 40 carbonos de longitud y pueden ser hidrocarburos puros, llamados carotenos, o poseen grupos funcionales oxigenados, en cuyo caso se llaman xantofilas(29). Los β carotenos son las moléculas de mayor eficacia antioxidante reconocida (23,30).

Las propiedades, y por lo tanto las funciones, de una molécula de carotenoide dependen principalmente de su estructura y, por lo tanto, de su química. En particular, el sistema de doble enlace conjugado se considera el factor individual más importante en las reacciones de transferencia de energía. Esta característica permite también la neutralización del radical oxígeno singlete, la función antioxidante de los carotenos más importante in vivo. Los carotenoides pueden interactuar con los radicales libres en tres formas principales, la transferencia de electrones, la abstracción de hidrógeno y la adición de una especie radical(25,31). Los mecanismos por los cuales los carotenoides ejercen su capacidad antioxidante en el ser humano dependen en gran medida de la naturaleza del radical libre en sí mismo.

D. Polifenoles

Los polifenoles son compuesto sintetizados por las plantas, cuya característica fundamental es la capacidad antioxidante determinada por la posición de los grupos hidroxilo. La disponibilidad de los hidrógenos fenólicos como secuestradores de radicales donantes de hidrógeno marca su potencial antioxidante(32). Básicamente se clasifican en dos grupos: flavonoides y no flavonoides.

Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos polifenólicos que forman parte esencial de la dieta de los seres humanos. Se encuentran ampliamente distribuidos en productos naturales y sus derivados (frutas, verduras, café, té, cerveza o vino). Se caracterizan por ser moléculas de bajo peso molecular, cuya estructura base está formada por tres anillos fenólicos(33).

De entre las múltiples funciones atribuidas a los flavonoides, destaca su capacidad antioxidante, dependiendo esta de la fusión del grupo hidroxilo o de un grupo carbonilo, y en la presencia de dobles enlaces (33,34). Además, los flavonoides tienen la capacidad de quelar iones metales de transición como el hierro o el cobre(34).

1.1.3.3. Antioxidantes no enzimáticos endógenos

A. Glutacion

El glutatión es un tiol compuesto por el tripéptido L- γ -glutamyl-L-cisteínglicina, moléculas unidas por puentes disulfuro, localizado principalmente en la matriz y citosol mitocondrial. Su síntesis, que es sobretodo hepática, depende de dos pasos enzimáticos consecutivos catalizados por la gamma-glutamyl-cisteína-sintetasa y la glutatión-sintetasa(35,36). El glutatión juega su papel fundamentalmente a nivel de diferentes compartimentos celulares: es el principal tampón en el mantenimiento del estado redox de la mitocondria, y su depleción se asocia a apoptosis o muerte mitocondrial(11,36). Además, es clave en el núcleo para la regulación de la división celular (36).

B. Ácido úrico

El ácido úrico se sintetiza principalmente en el hígado e intestino, pero también en otros tejidos como los músculos, los riñones y el endotelio vascular, siendo el producto final de la metabolización de purinas que proceden de proteínas animales. El ácido úrico es la molécula antioxidante predominante en el plasma (37), siendo eficaz contra el oxígeno singlete, radicales de peróxido e hidroxilo, y protege la membrana de los eritrocitos de la peroxidación lipídica(25). El ácido úrico es un sustrato oxidable, convirtiéndose en alantoína vía la enzima urato oxidasa, y actúa como donador de electrones, por lo que elimina radicales libres. Además, puede quelar iones metálicos, como hierro y cobre, convirtiéndolos en formas poco reactivas que no pueden catalizar reacciones de radicales libres(38).

C. Bilirrubina

Las propiedades lipofílicas de la bilirrubina, le confiere capacidad protectora de las membranas lipídicas, previniendo su peroxidación. Es especialmente activa frente a radicales peroxilo, y previene la acción mutágena de las especies reactivas(25).

D. Proteínas fijadoras de metales

Determinadas proteínas como la transferrina, ferritina, lactoferrina, ceruloplasmina e incluso albúmina se consideran antioxidantes no enzimáticos debido a que actúan secuestrando iones de metales de transición responsables de la generación de la mayoría de las especies reactivas de oxígeno (25)

E. Melatonina

Melatonina: síntesis y secreción

Cada vez es mayor la evidencia que señala a la melatonina como una potente molécula antioxidante.

Se trata de una indolamina secretada principalmente por la glándula pineal. Su síntesis en los pinealocitos muestra un claro patrón circadiano, alcanzando sus máximos niveles durante la noche.

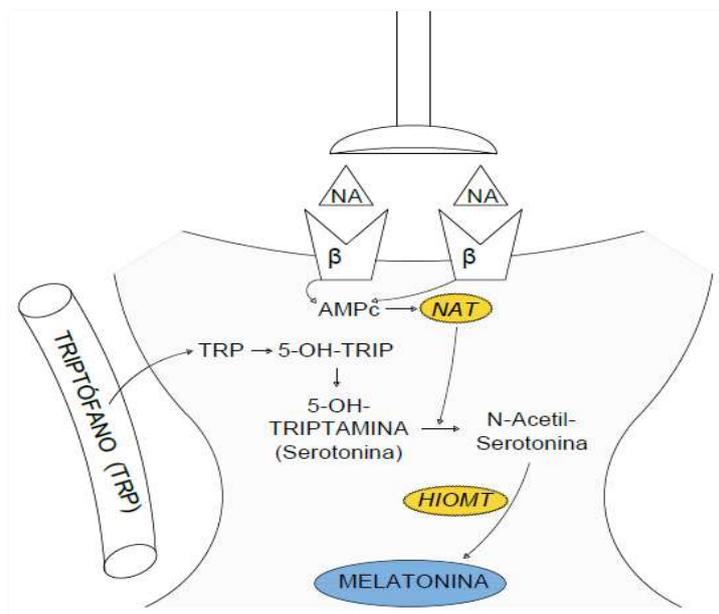
Dicha ritmicidad depende de la información lumínica que llega desde la retina, vía el haz retículo-hipotalámico, hasta el núcleo supraquiasmático, que actúa como director de orquesta del reloj biológico humano. La señal presináptica llega al ganglio cervical superior a través del diencéfalo, y, desde él, la vía postsináptica en forma de fibras noradrenérgicas, llega a la glándula pineal. La noradrenalina se libera durante la noche, fijándose en los receptores beta-adrenérgicos de la membrana de los pinealocitos, promoviendo la síntesis de la melatonina.

La liberación de noradrenalina es prácticamente nula durante el día (o fotofase) y aumenta durante la noche (escotofase) en todos los mamíferos. Este mecanismo horario endógeno asegura la sincronización de la fisiología celular con el ambiente incluyendo el ciclo luz-oscuridad, la temperatura corporal e incluso la ingestión de alimentos (39). La luz de suficiente duración e intensidad suprime la producción nocturna de melatonina (39,40). La síntesis de melatonina en la glándula pineal también está influenciada por los neuropéptidos, como el péptido intestinal vasoactivo, el péptido activador de la adenilato ciclasa pituitaria y el neuropéptido Y (41).

La síntesis se inicia a partir de su precursor plasmático, el triptófano. A partir del triptófano, y gracias a dos reacciones enzimáticas mediadas por la N-acetiltransferasa y O-metiltransferasa se sintetiza la melatonina. En primer lugar, el triptófano es hidroxilado a 5-hidroxitriptófano que a su vez es decarboxilado a 5-hidroxitriptamina (serotonina).

Posteriormente, la serotonina es convertida en el precursor de la melatonina, N-acetilserotonina por el enzima N-acetiltransferasa. La N-acetilserotonina, vía el enzima hidroxiindol-o-metiltransferasa, es convertida finalmente en melatonina.

Figura 1. Representación gráfica de la síntesis de melatonina en el pinealocito.



La NA (noradrenalina) es liberada en las terminaciones nerviosas simpáticas postganglionares. La NA interactúa en los receptores β del pinealocito, estimulando la síntesis de AMPc promoviendo la inducción y activación de N-acetil transferasa (NAT), La NAT convierte la Serotonina proveniente del derivado del Triptófano (TRP), la 5-hidroxitriptamina (5-OH-TRIP), a N-acetil serotonina (NAS), la cual es O-metilada por la hidroxindol-O-metiltransferasa (HIOMT) y convertida a Melatonina. Adaptado de Reiter et al. 2010(39).

Recientemente se ha demostrado que la melatonina se sintetiza además en una gran variedad de tejidos, como la propia retina, la piel, la médula ósea o el tracto gastrointestinal, tejido especialmente importante, ya que se ha postulado una posible estimulación y liberación de melatonina desde el tracto gastrointestinal tras la ingesta de suplementos del precursor de la melatonina, el triptófano (41,42).

Melatonina: circulación, receptores y metabolismo

Se trata de una molécula anfifóbica, con capacidad tanto hidrofílica como lipofílica, por lo que una vez sintetizada no se almacena, y desde la glándula pineal, atraviesa la barrera hematoencefálica y difunde fácilmente al líquido cefalorraquídeo y plasma. Las concentraciones de melatonina en el líquido cefalorraquídeo son mayores a mayor proximidad con la glándula pineal, disminuyendo rápidamente en líquido cefalorraquídeo, tal cual aumenta su concentración a distancia en el plasma (40,43).

La melatonina a su vez ejerce el efecto cronobiológico sobre el núcleo supraquiasmático vía dos receptores: MT1 y MT2. Además, estos receptores se encuentran prácticamente de forma ubicua en todas las membranas celulares, por lo que el funcionalismo celular está sujeto al ritmo circadiano que marca o determina el reloj biológico desde el núcleo supraquiasmático.

El metabolismo de la melatonina es fundamentalmente enzimático en el hígado, vía la familia enzimática de las citocromo P450 mono-oxidasas, para posteriormente conjugarse con sulfato en 6-sulfatoximelatonina y ser excretada por la orina. La vida media de melatonina en plasma es muy corta, generalmente es eliminada por la orina en unos 20 minutos. Además, algunos tejidos neurales, como la propia glándula pineal, contiene enzimas desacetilantes de melatonina, que son melatonina desacetilasas específicas. Por lo que la melatonina se transforma en 5-metoxitriptamina en cualquier tejido que lleve este tipo de enzimas (41).

La determinación de melatonina en plasma en sujetos sanos demuestra un incremento a partir de las 20-22h, a partir del cual los niveles aumentan desde un umbral inferior, que suele estar por debajo de los 10 pg/ml. El pico o máximo nivel de melatonina en plasma se alcanza entre las 00 y las 04h de la madrugada de forma generalizada, llegando a niveles pico que pueden llegar a los 200 pg/mL. Aunque existe cierta variabilidad en los niveles pico o umbral de cada sujeto, la curva que describe la determinación seriada plasmática de melatonina a lo largo de toda la noche en individuos sanos sigue el mismo patrón horario llegando a los máximos niveles en torno a la medianoche (44,45). La determinación del metabolito de la melatonina en orina ha mostrado buena correlación con los niveles plasmáticos (45).

Melatonina: funciones

Dada su fácil difusibilidad, la melatonina puede ejercer funciones en prácticamente todas las células del cuerpo.

Además de la influencia en el estado de sueño-vigilia, la melatonina tiene otras importantes implicaciones fisiológicas. Se han descrito receptores para melatonina tanto citosólicos como a nivel nuclear celular de forma prácticamente ubicua en el organismo, ya que cruza todas las barreras y se distribuye a todos los niveles subcelulares (46).

A nivel fisiológico, los efectos antioxidantes e inmunomoduladores de la melatonina pueden ser determinantes en la patogénesis de muchas enfermedades.

- **INFLUENCIA COMO ANTIOXIDANTE.** La melatonina actúa a nivel subcelular regulando señales de transducción, así como en la homeostasis redox (47). Se puede asegurar que la melatonina tiene un poderoso efecto antioxidante. Por un lado, ha demostrado tener mayor capacidad para neutralizar al radical hidroxilo, el radical de oxígeno más dañino, que otras moléculas (48). El radical peroxilo es indirectamente neutralizado por la melatonina debido a que disminuye el grado de iniciación de la peroxidación lipídica llevada a cabo por otras moléculas como el radical hidroxilo (48,49). Por un lado, la melatonina actúa a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial mediante un complejo ciclo de donación/recepción de electrones, evitando así la producción de radicales libres (50). Por otro lado, la melatonina ejerce sus propiedades antioxidantes estimulando la síntesis de enzimas antioxidantes, especialmente para superóxido dismutasa, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. Además, inhibe la producción de enzimas pro-oxidantes y potencia la acción de otras sustancias antioxidantes (42,50-52). Este tipo de reacciones antioxidantes se ha atribuido a dosis farmacológicas de melatonina cuando se administra externamente. Su uso externo como antioxidante al utilizarla en recién nacidos en el contexto de situaciones inflamatorias o

infecciosas, ha demostrado mejorar los parámetros de estrés oxidativo, al compararlos con controles en algunas investigaciones (53,54). Su administración experimental en recién nacidos con patología como displasia broncopulmonar, asfixia perinatal, enterocolitis necrotizante o retinopatía de la prematuridad también ha demostrado efectos beneficiosos (55–57). Sin embargo, estudios recientes sugieren que los niveles sanguíneos de melatonina no se correlacionan con el contenido de melatonina a nivel subcelular, de forma que los niveles fisiológicos de melatonina a nivel tisular podrían ser suficientes para ejercer su acción antioxidante (48,50).

- **INFLUENCIA COMO INMUNODULADORA:** A nivel del sistema inmunológico ejerce funciones inmunomoduladoras debido a su influencia en el sistema inmunitario vía activación de células T-helper 1 y por consiguiente la liberación de citoquinas como IFN γ , IL 1, IL 6 e IL 12 (58,59); tiene además poder anti-inflamatorio bajo circunstancias donde existe una exagerada respuesta inflamatoria (46,47,60,61). Por otro lado, la melatonina también puede ser un “objetivo” o “diana” para la perpetuación del daño en caso de inflamación, ya que muchas de las respuestas inflamatorias suprimen la producción nocturna de melatonina (47,62,63).

Bajo esta base antiinflamatoria y antioxidante, se han atribuido a la melatonina numerosos efectos beneficiosos a nivel clínico o incluso experimental con melatonina exógena. Se han descrito efectos beneficiosos a nivel cardiovascular debido a sus acciones hipotensoras y vasorrelajantes tras fenómenos isquémicos (59,64). También se ha postulado que la interrupción en la producción nocturna de melatonina puede relacionarse con algunos tipos de cáncer, por lo que se le atribuyen propiedades oncostáticas (39,65–68). A nivel de sistema nervioso central, la melatonina juega un importante papel en la evolución de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer o Parkinson, tanto a través de los receptores MT1/MT2, como por su efecto antioxidante o

incluso favoreciendo la proliferación y diferenciación de las células madre del sistema nervioso central (69,70). Se han demostrado receptores de melatonina en los tejidos que intervienen en los ciclos reproductivos, tanto a nivel de hipotálamo como en ovarios, de forma que se puede afirmar la existencia de un eje hipotálamo-pineal-gonadal. Los ritmos normales de melatonina están relacionados con los de las hormonas sexuales, y, por tanto, ejerce un papel importante en la pubertad, reproducción y trastornos menstruales (41,71,72).

1.1.3.4 Consecuencias moleculares del estrés oxidativo

A la clásica definición del estrés oxidativo, es decir, el desbalance entre los mecanismos pro-oxidativos y antioxidantes a favor de los oxidantes, hay que añadirle el daño molecular secundario a la disrupción en la señalización del equilibrio de reducción/oxidación (la homeostasis redox, mantenida por varios sistemas a diferentes niveles celulares, como el ciclo reducción/oxidación del glutatión)(73). Además, dependiendo de la intensidad de estrés oxidativo, este puede ser clasificado desde “leve” o “fisiológico” hasta “alta intensidad”. Del mismo modo, podría clasificarse en agudo, crónico o repetitivo según el tiempo de exposición (73). Una vez establecido daño oxidativo sobre una molécula, esta a su vez, puede actuar como ROS y propagarse así el daño molecular por estrés oxidativo.

Las ROS tienen la capacidad de reaccionar con todo tipo de moléculas, por lo que pueden establecer daño sobre el DNA, los lípidos y las proteínas, así como favorecer los mecanismos de apoptosis o muerte celular.

A. Daño sobre el DNA

La mutagénesis espontánea bajo condiciones aeróbicas es mucho mayor que en anaerobiosis (73). El daño al ADN inducido por ROS implica roturas de ADN monocatenarias o bicatenarias, modificaciones de purina, pirimidina o desoxirribosa y

enlaces cruzados de ADN. Entre las bases de ADN, la guanina es más susceptible al daño oxidativo. La principal lesión mutagénica da origen a la 8-oxo-7,8-dihidroguanina. El daño del ADN puede originar también en la disrupción en la transcripción, errores de replicación e inestabilidad genómica, asociados todos ellos a la carcinogénesis (13,73).

B. Daño sobre proteínas

Cuando las proteínas reaccionan con el $\text{OH}\cdot$ hay una extracción de un átomo de hidrógeno del polipéptido de la proteína, formando un radical que reacciona fácilmente con el O_2 para formar ROS en condiciones aeróbicas. Las cadenas laterales de todos los aminoácidos son susceptibles a la oxidación por acción de ROS, especialmente la cisteína y metionina. El hierro fijado a las proteínas puede inducir la reacción de Fenton en presencia de H_2O_2 generando más ROS y, perpetuando así, el daño oxidativo(13).

C. Daño sobre lípidos

Los lípidos son otro foco objeto del daño oxidativo, especialmente los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, en los que se produce la peroxidación lipídica. Tanto el $\text{OH}\cdot$, como el hidroperoxilo y el $\text{O}_2\cdot^-$ pueden reaccionar con los ácidos grasos de los fosfolípidos para formar hidroperóxidos lipídicos, que, una vez formados, pueden reorganizarse a través de una reacción cíclica a endoperóxidos, que son precursores de malondialdehído, MDA, un importante marcador de estrés oxidativo (13).

D. Daño sobre carbohidratos

El daño oxidativo a la cadena principal de azúcar de los ácidos nucleicos causa roturas de cadena. Los carbohidratos libres generan oxidantes tales como grupos carbonilo reactivos. La glucosilación no enzimática, la etapa inicial de la reacción de Maillard (conjunto de reacciones químicas que se producen con el calentamiento de algunos alimentos como la carne o el pan), genera productos de glucoxidación que se acumulan y a su vez generan estrés oxidativo(73). Además, el daño oxidativo adquiere

importancia cuando se trata de polisacáridos con función estructural, ya que los polisacáridos son despolimerizados por radicales libres alterando sus funciones celulares (74).

1.1.4. Maduración del sistema antioxidante

En el periodo perinatal, existe una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo debido a algunas particularidades del recién nacido, especialmente a la falta de sistemas antioxidantes que llegarán a la madurez en el primer año de vida. También existen otras condiciones predisponentes, como la deficiencia relativa de los sistemas antioxidantes neonatales en plasma y eritrocitos (actividades enzimáticas bajas como GPx y SOD, bajo contenido de vitamina E y ácido ascórbico) o la mayor susceptibilidad al estrés oxidativo debido al aumento de la disponibilidad de metales de transición como hierro libre, aumento de la producción de radicales superóxido, aumento del contenido de ácidos grasos y aumento de la peroxidación de la membrana(75). Además, se han encontrado diferencias en el contenido del GSSG entre recién nacidos y adultos, siendo mayor en recién nacidos, lo que demuestra que éstos están sometidos a un mayor estrés oxidativo(76).

Aproximadamente el 150% del incremento enzimático de SOD, catalasa o GPX ocurre al final de la gestación (durante el último 15% de la misma), lo cual va en paralelo con la producción de surfactante pulmonar (77). La expresión de las diferentes enzimas antioxidantes a lo largo de la gestación en los diferentes compartimentos materno-fetales va aumentando (la SOD1 es abundante en el miometrio, sincitotrofoblasto y decidua al final de la gestación; la SOD2 también abunda en dichos departamentos además del endotelio de las vellosidades fetales; la expresión intracelular de SOD3 abunda en el trofoblasto en el primer trimestre y a nivel de la matriz extracelular a partir de la semana 17 de gestación)(77).

Se han encontrado en plasma materno aumento progresivo en la capacidad antioxidante total (CAT) o el ácido úrico durante el avance de la gestación normal, así como incrementos en hidroperóxidos lipídicos, lo que radica en mayor estrés oxidativo al final de la gestación (78).

A pesar de la evidencia de la reducción de la capacidad antioxidante en la patogenicidad de muchas enfermedades perinatales, no existe beneficio respecto a la suplementación materna con altas dosis de antioxidantes al final del embarazo (79).

Respecto a la melatonina, a nivel intraútero, el feto depende de la producción materna de melatonina. A pesar de haberse identificado receptores para melatonina en tejidos fetales, tanto humanos como animales, así como demostrarse una excelente difusibilidad de la melatonina a través de la placenta (80), los niveles plasmáticos o salivares de melatonina en los lactantes pequeños son indetectables. Los primeros estudios que describen el ritmo de secreción de melatonina en lactantes sanos, desde la época neonatal, y teniendo en cuenta la influencia de la exposición a la luz, así como la temperatura o los ritmos de alimentación, no encuentran incrementos nocturnos en la secreción de melatonina hasta aproximadamente los 2 meses de edad, momento a partir del cual, aumentan hasta alcanzar niveles similares a los descritos en adultos en torno a los 6 meses de vida (81). Además, los niveles de melatonina en plasma materno de mujeres embarazadas, aumentan progresivamente durante la gestación, descendiendo tras el parto a los niveles similares a mujeres no embarazadas, encontrando diferencias significativas cuando acontecen fenómenos como retraso del crecimiento intraútero o preeclampsia, con niveles más altos de melatonina (82). Este fenómeno se ha descrito también a nivel postnatal tras fenómenos perinatales estresantes, como en caso de distrés respiratorio neonatal, donde los niveles matutinos de melatonina son detectables precozmente, tanto en recién nacidos a término como en prematuros, sugiriendo una importante función como protector antioxidante (83).

1.1.5. Papel del estrés oxidativo en la patogenia de enfermedades en perinatología

Los recién nacidos y especialmente los prematuros son más propensos al estrés oxidativo que en edades posteriores. Esto es debido a varias razones: la exposición a altas concentraciones de oxígeno, la mayor frecuencia de infecciones o fenómenos inflamatorios, junto a una defensa antioxidante reducida, y a la presencia de más hierro libre que acelera la reacción de Fenton.

1.1.5.1. Reanimación neonatal

Durante la transición de feto a neonato en el momento del nacimiento, se produce la liberación fisiológica de ROS debido a que existe un incremento considerable en la disponibilidad de O₂ en el ambiente, de modo que la presión parcial arterial de O₂ neonatal aumenta bruscamente desde 3.1 kPa a 9.3 kPa (84). Diversos estudios demuestran el papel perjudicial de la administración rutinaria de concentraciones de oxígeno mayores al 21% en la época perinatal, especialmente durante la reanimación neonatal, con peores resultados en la reanimación cardiopulmonar, o peores resultados neurológicos a largo plazo (84–90). De hecho, en la actualidad, las guías internacionales recomiendan evitar concentraciones de oxígeno mayores al 21% en la reanimación neonatal (91).

1.1.5.2. Isquemia-reperfusión neonatal

Durante los fenómenos de isquemia-reperfusión neonatal, el déficit en la defensa antioxidante neonatal contribuye a la liberación de ROS y consecuente daño molecular e inactivación de funciones celulares clave, provocando finalmente la muerte celular. La acumulación de ROS y estrés oxidativo consecuente se inicia de forma precoz durante la hipoxia-isquemia debido al aumento en la concentración de Ca²⁺ + citosólico, lo que origina a una alteración del Ca²⁺ + mitocondrial. La fase de reperfusión / reoxigenación

inmediatamente después de hipoxia-isquemia contribuye por lo tanto significativamente a la lesión cerebral. Durante la reperfusión del cerebro previamente isquémico, la producción de ROS inducida por calcio y empeorada en exceso con la reoxigenación, pueden dar lugar a la formación de especies oxidantes altamente citotóxicas(92).

1.1.5.3. Estrés oxidativo e inflamación

Se ha encontrado una estrecha relación entre marcadores inflamatorios y el estrés oxidativo. En situaciones como en la sepsis neonatal, existe una elevación del Factor de Necrosis Tumoral Alpha (TNFalpha) y de enzimas antioxidantes como la SOD y la GPx en el suero de estos recién nacidos, lo que indica aumento del estrés oxidativo en la sepsis. Las ROS también han sido implicadas como segundos mensajeros que actúan en las vías principales de transducción de citoquinas y de factores de crecimiento. El aumento del estrés oxidativo podría influir por tanto en el crecimiento y el desarrollo. Especialmente en el período perinatal, la vulnerabilidad del sistema nervioso al estrés oxidativo es mayor. Las consecuencias a largo plazo de esto no se conocen (93).

1.1.5.4. Enfermedades propias de la prematuridad

Se ha descrito la importancia del estrés oxidativo en diversas enfermedades propias de la prematuridad (94). Es especialmente importante el papel del estrés oxidativo en patologías como la displasia broncopulmonar, retinopatía de la prematuridad, ductus arterioso persistente, enterocolitis necrotizante o leucomalacia periventricular.

1.2. El parto normal

El desencadenante del proceso del parto es el resultado de una compleja interacción entre esteroides, agentes vasoactivos, prostaglandinas, células inflamatorias y la liberación de citoquinas. Así, el parto es una de las excepcionales situaciones en las que la activación de los procesos inflamatorios ejercen un papel fisiológico (95). La senescencia de las células de membrana fetal, los relojes endocrinos circadianos y los factores inflamatorios y mecánicos se coordinan como iniciadores del parto, modificados o no por el estrés oxidativo y otros factores, generando una cascada de señalización a través de los diferentes compartimentos uterinos, que promueve la extracción funcional de progesterona en el miometrio, lo que lleva a una mayor contracción de la célula miometrial y a la activación del parto(96).

Un desequilibrio en alguno de estos factores puede tener consecuencias perinatales patológicas. Por ejemplo, la infección puede inducir el parto prematuro mediante la hiperactivación de los mecanismos inflamatorios (97)

1.2.1. Mecanismos inflamatorios implicados en el parto

Durante el parto se producen los fenómenos de “activación inflamatoria”, consistentes en la proliferación de células inflamatorias, así como mediadores inflamatorios y cascadas de señalización, clave en este proceso. Dicha activación inflamatoria ocurre a todos los niveles tisulares, necesaria para la coordinación del trabajo del parto. Los cambios pre-parto ocurren en el útero sobre la semana 37, mientras que los cambios inflamatorios en las membranas fetales o el cérvix están presentes desde la semana 25 aproximadamente. Además, los genes implicados en el proceso inflamatorio se regulan positivamente, lo que colabora en la amplificación de la señal inflamatoria. Determinadas citoquinas o mediadores inflamatorios (como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8)

aumentan en el líquido amniótico tal cual avanza la gestación, y especialmente, tras haberse iniciado el parto (98).

Se ha demostrado que la concentración de citoquinas inflamatorias en las secreciones cervicovaginales aumentan durante el parto espontáneo a término, alcanzando su pico con la dilatación completa. En ciertas ocasiones, se produce un mayor aumento de citoquinas. Así los niveles de TNF- α aumentan tras la ruptura espontánea de membranas (99).

Los macrófagos son los principales productores de estas citoquinas. Todas las membranas fetales influyen en el proceso inflamatorio del parto, pero la decidua, al final de la gestación, tiene la mayor concentración de leucocitos (neutrófilos y macrófagos) de los tejidos intrauterinos, y expresa los mayores niveles de citoquinas proinflamatorias, que aumentan durante el proceso del parto espontáneo (especialmente, IL-1 β , IL-6, IL-8)(100). Estas citoquinas, además, estimulan la producción de prostaglandinas y de la expresión de su receptor, así como inhiben la producción de cortisol mediante la inhibición de la 11- β -deshidrogenasa placentaria, evitando así una excesiva exposición del cortisol intraútero (101).

1.2.2. Estrés oxidativo en el parto

La transición fetal-neonatal implica un importante impacto en cuanto al estrés oxidativo se refiere. Por un lado, los fenómenos cíclicos de isquemia-reperusión secundarios a los cambios de flujo útero-placentario durante las contracciones del parto; por otro lado, el brusco aumento de la disponibilidad del oxígeno, al pasar de un ambiente uterino relativamente hipóxico, al aire ambiente, con incrementos en la PaO₂ por encima de 5 veces los valores previos. Además, los procesos inflamatorios que se dan lugar durante el parto, son una fuente importante de especies reactivas de oxígeno, perpetuando a su vez, más inflamación, en un círculo vicioso(102).

Los estudios en cuanto al papel del estrés oxidativo en el momento del parto muestran resultados heterogéneos. De forma global, siempre se documenta un aumento en el estrés oxidativo y en marcadores inflamatorios en el momento del parto, tanto en plasma materno, como en menor medida, en los recién nacidos (102–104). Los niveles crecientes de ROS que se han acumulado en la cavidad intrauterina tienen la capacidad de dañar y acelerar la senescencia de la membrana fetal al dañar proteínas, lípidos y ADN en la célula, lo que a su vez reduce los telómeros y acelera el ciclo celular, la senescencia de las membranas fetales asociadas con la rotura prematura de membranas prematura y a término(96).

En cuanto a patología, sí se ha demostrado, una mayor morbi-mortalidad en prematuros con elevados valores indirectos de peroxidación lipídica en cordón umbilical tras el parto, en pretérminos que han desarrollado alguna patología basada en el estrés oxidativo, como la retinopatía del prematuro o la enterocolitis necrotizante(105).

El papel exacto del estrés oxidativo demostrado durante el parto normal es todavía desconocido. Existe una regulación a la alza en los mecanismos antioxidantes tras el parto natural, lo que le confiere al recién nacido una protección antioxidante. Dado que la maduración del sistema antioxidante es edad gestacional-dependiente, por lo tanto, el parto prematuro significa per se un riesgo aumentado ante las ROS(14,106,107). Esta regulación a la alza parece implicar tanto a los mecanismos antioxidantes enzimáticos (como la SOD3 o la GPx) como a los no enzimáticos (melatonina)(108).

El parto en humanos tiene una clara distribución horaria, siendo máximo entre las 24:00 y las 5:00 am. Los niveles de melatonina en el líquido amniótico o la orina de mujeres embarazadas aumentan durante el parto. Los cambios en los niveles circulantes de melatonina, sincronizados con los ciclos de luz/oscuridad, juegan un papel importante en determinar el momento del parto (109). En humanos, la melatonina es uterotónica, favoreciendo la acción de la oxitocina. Se especula, que la supresión de melatonina puede disminuir el trabajo de parto (110), habiéndose demostrado la presencia de receptores de

melatonina en el miometrio, independientemente del embarazo (111). En mujeres embarazadas tras trabajo de parto, se ha objetivado sinergismo entre la melatonina y la oxitocina, favoreciendo la contracción de las células miometriales (112).

1.3. Parto por cesárea

1.3.1. Epidemiología

La tasa de cesáreas a nivel mundial experimenta desde hace décadas, un ascenso preocupante. Mientras que la tasa óptima de cesáreas, considerada por la OMS está en torno al 10-15% (113), esta cifra es superada considerablemente por la mayoría de países. En una reciente revisión de la tasa de cesáreas por países, publicada en Lancet en 2018 (114), la tasa global a nivel mundial es del 21.1% en 2015, el doble que lo reportado en el año 2000. Además del aumento de esta práctica en países en desarrollo, la mayor tasa de cesáreas se observa en las regiones más ricas y en el ámbito de la medicina privada. En España, este indicador sanitario se sitúa en el 25% en el año 2016, con un amplio rango dependiendo del territorio, entre 14.1 y 28.9, siendo la Comunidad Valenciana la segunda a la cabeza de tasa de cesáreas, con una tasa publicada a fecha de 2016 del 28.7% (115).

Aunque el parto por cesárea se asocia a la prematuridad o mayor edad materna, ninguna de estas variables se ha demostrado con influencia estadísticamente significativa sobre la tasa de cesáreas, así como tampoco las diferencias en los niveles asistenciales de los hospitales con servicio de obstetricia, dependiendo en muchas ocasiones de la práctica clínica (116).

Los mecanismos fisiológicos implicados en el proceso del parto vaginal o natural están ausentes cuando se trata de cesáreas electivas, lo que podría tener consecuencias perinatales a corto y largo plazo(117). La encuesta mundial de la OMS 2004-2008 sobre salud materna y perinatal, para ver los resultados perinatales dependiendo del tipo de parto, cualquier modo de parto diferente al parto vaginal no instrumentalizado,

presentaron una mayor riesgo de muerte, ingreso a la UCI, transfusión de sangre e histerectomía, incluida la cesárea anteparto sin indicaciones médicas, así como la cesárea intraparto sin indicaciones médicas(118).

Existe un riesgo aumentado de morbilidad respiratoria en el recién nacido tras el nacimiento por cesárea, de hasta 2-3 veces sobre el riesgo tras parto vaginal. Además de las demostradas consecuencias a corto plazo (sobretudo a nivel respiratorio o de termorregulación en el recién nacido), cada vez es mayor la evidencia que demuestra mayor morbilidad a largo plazo, como mayor riesgo de diabetes tipo 1 o asma, así como alteraciones inmunológicas, obesidad y alteraciones neurológicas (119).

Son necesarios estudios controlados con el objetivo de comparar los posibles efectos adversos entre el parto por cesárea y el parto vaginal, con el objetivo de tomar futuras medidas preventivas para evitar potenciales riesgos en el recién nacido (120).

1.3.2. Respuesta inflamatoria en el parto por cesárea

La cesárea, como cualquier cirugía mayor, puede provocar cambios inflamatorios con incremento en citoquinas pro-inflamatorias, y por consiguiente, alteraciones hemodinámicas que aumentan la morbi-mortalidad materna.

Dentro de la variedad de citoquinas, se han caracterizado algunas con más profundidad, como el TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 (121):

- El TNF- α es uno de los más precoces y potentes mediadores inflamatorios tras daño tisular tras cirugía. Las principales fuentes de son los macrófagos y células T, abundantes en tejido esplácnico. Aunque la vida media del TNF- α es inferior a 20 minutos, esta es suficiente para provocar cambios metabólicos y hemodinámicos importantes, así como para activar mediadores inflamatorios distalmente a través de la cascada de citocinas.

- La IL-1 es liberada por macrófagos activados y células endoteliales. Existen dos isoformas, la IL-1- α , que ejerce sus efectos sobretudo a nivel local, y la IL-1- β , que actúa

distalmente, similar al TNF- α , y actuando sinérgicamente con éste. La IL-1 además, estimula la producción de prostaglandinas en el hipotálamo.

- TNF- α e IL-1 son potentes inductores de la producción de IL-6 de prácticamente todas las células y tejidos. Los niveles circulantes de IL-6 aumentan a partir de los 60 minutos tras el daño, y pueden persistir hasta 10 días, siendo proporcionales a la extensión del tejido dañado, y no a la duración de la cirugía. La IL-6 no solo induce la activación de neutrófilos durante la lesión e inflamación, sino que también puede retrasar la eliminación fagocítica de neutrófilos disfuncionales, prolongando así los efectos perjudiciales. Al mismo tiempo, tiene efectos antiinflamatorios, atenuando la actividad del TNF- α e IL-1.

- La expresión y actividad de la IL-8 está temporalmente ligada a la IL-6, siendo adicional a ésta.

- La IL-10 actúa como modulador de la actividad del TNF- α , así como atenuante de la transcripción de la IL-8, por lo tanto, es una citocina antiinflamatoria.

Desde el punto de vista de la evidencia científica, los estudios sobre las diferencias en los marcadores de inflamación entre parto vaginal y cesárea son heterogéneos.

En general, existe mayor riesgo de alteraciones inmunológicas en los partos por cesárea, que además pueden persistir a lo largo del tiempo, relacionando parto por cesárea con enfermedades de base inmunológica en el niño, como la dermatitis atópica (122).

1.3.3. Estrés oxidativo en el parto por cesárea

Tal cual se ha expuesto, el estrés oxidativo es el resultado de un desbalance entre los sistemas pro y antioxidantes. Las ROS son fundamentales en múltiples procesos fisiológicos, incluidos los procesos ligados a la reproducción humana, embarazo y parto. Un exceso en su producción o un defecto en su eliminación (déficit antioxidante) podría provocar daño molecular con consecuencias a corto y largo plazo desconocidas. Las

investigaciones referentes al estudio de diferencias en los parámetros de estrés oxidativo dependiendo del tipo de parto, muestran resultados heterogéneos.

Las publicaciones hasta la fecha en este sentido, analizan los parámetros de estrés oxidativo en sangre de cordón umbilical, y comparan, generalmente, el estrés oxidativo objetivado entre partos vaginales y cesáreas electivas a término, sin patología gestacional ni perinatal reseñable. Algunos estudios encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambos tipos de parto, mediante la determinación de la actividad enzimática de la SOD o la CAT, siendo mayor en los partos por cesárea, concluyendo, por tanto, mayor estrés oxidativo en los partos por cesárea (123). Estos resultados se confirman posteriormente en otra investigación, donde los niveles de SOD y GPX, aunque no de CAT, son mayores en la sangre de cordón de los recién nacidos tras cesárea electiva (124). En otro estudio, de similar diseño, se objetiva menor actividad de CAT o de GPx en sangre de cordón umbilical tras el parto por cesárea, interpretando una menor capacidad antioxidante tras el parto por cesárea, por lo que los autores concluyen mayor vulnerabilidad al estrés oxidativo en estos recién nacidos (125).

También se han documentado menores niveles de GSH, el mayor antioxidante encontrado en eritrocitos, en sangre venosa umbilical de partos por cesárea electiva, al compararlos con partos vaginales (126).

En lo que a marcadores de estrés oxidativo se refiere, las investigaciones encuentran resultados heterogéneos. Algunos estudios encuentran más estrés oxidativo en sangre fetal y/o materna tras la práctica de una cesárea (127-130). Sin embargo, otros estudios no encuentran diferencias en marcadores de estrés oxidativo, ni en la capacidad antioxidante total dependiendo del tipo de parto (131,132), mientras que otras investigaciones sugieren que el incremento del estrés oxidativo en sangre fetal es secundario al propio proceso del parto con dinámica (133).

Al comparar también, no sólo los marcadores de estrés oxidativo puro, sino también, los marcadores del contenido antioxidante, como la SOD o GPx, algunos estudios

muestran diferencias a favor de los partos vaginales, sugiriendo mayor estrés oxidativo en los partos espontáneos (108,134). Además, también se han documentado mayores niveles de melatonina en sangre de cordón umbilical tras partos vaginales, aunque estos niveles no parecen influir en el contenido de otros marcadores antioxidantes, como la SOD o GPx (108).

Con el propósito de esclarecer el impacto que el estrés oxidativo en función del tipo de parto tiene sobre el recién nacido, se publicó en 2013 una revisión de la literatura en este sentido, donde a pesar de encontrar muchas diferencias o resultados divergentes en los diferentes parámetros de estrés oxidativo, no se puede concluir que estas diferencias sean significativas, debido sobre todo a los diferentes indicadores de estrés oxidativo utilizados, así como, a la ausencia de datos sobre algunos factores de confusión que podrían ser determinantes, como la edad materna, o el estrés del dolor durante el parto (135).

1.4. Lactancia materna

1.4.1. Aspectos nutricionales de la leche materna

En la actualidad, existe una enorme evidencia científica que demuestra que la lactancia materna es el mejor alimento para el recién nacido y el niño durante los 2 primeros años de vida. Son numerosos los beneficios en cuanto a morbi-mortalidad infantil, así como beneficios tanto para la madre como a nivel social y económico, por lo que los organismos internacionales en el ámbito sanitario y de salud pública así lo recogen y recomiendan en sus guías y publicaciones (136,137).

La composición de la leche materna es dinámica, y varía durante una misma toma, a lo largo del día, durante las diferentes fases de todo el periodo de amamantamiento, y entre madres y poblaciones (138).

Durante los primeros días tras el parto, aparece el calostro, cuya producción en volumen es escasa pero suficiente para satisfacer las necesidades del recién nacido, a nivel inmunológico y trófico sobre las necesidades nutricionales. Se trata de una leche rica en sustancias inmunológicas y factores de crecimiento (IgA, lactoferrina, leucocitos, factor de crecimiento epidérmico) (139). A lo largo de los siguientes días, tras la caída estrogénica post-parto, aparece la activación secretora y aparición de la leche de transición (lactogénesis II), generalmente entre el tercer día hasta las dos primeras semanas tras el parto. En la leche de transición aumenta el contenido en sodio, citrato y lactosa. La leche de transición comparte algunas de las características del calostro pero representa un período de producción de leche "acelerada" para satisfacer las necesidades nutricionales y de desarrollo del bebé en rápido crecimiento. De cuatro a seis semanas después del parto, la leche humana se considera completamente madura. Tras los cambios importantes en la composición observados en el primer mes de vida, la leche humana sigue siendo relativamente similar, aunque ocurren cambios sutiles en la composición de la leche durante todo el curso de la lactancia (138). En cuanto a los componentes nutricionales y

no nutricionales de la leche materna, existe una amplia bibliografía al respecto, con variaciones que dependen de la forma de recogida o almacenamiento de las muestras de leche materna en los estudios. De forma global, utilizaremos la revisión de Ballard et al, del 2013. De todas formas, la composición de leche materna se puede sintetizar del siguiente modo (138):

- **Proteínas.** Las proteínas más abundantes son la caseína, α -lactoalbúmina, lactoferrina, seroalbúmina, lisozima e IgA. Los niveles de proteínas descienden entre el primer y segundo mes de lactancia, y son mayores en la leche de madres que han parido de forma prematura.

- **Grasas.** Son el componente más variable en la leche materna. Se trata fundamentalmente de ácido oleico y ácido palmítico. La concentración de grasa es mayor al final de la toma que al inicio de la misma, y mayor en las tomas centrales del día, que en la noche o primera hora de la mañana. El perfil lipídico de la leche materna está influenciado por la dieta materna, sobre todo para los ácidos grasos de cadena larga.

- **Hidratos de carbono.** El principal azúcar de la leche materna es la lactosa. Es el componente menos variable y más abundante de la leche materna.

- **Micronutrientes.**

1.4.2. Componentes bioactivos de la leche materna.

Además del aspecto puramente dietético, el concepto de nutrición es mucho más amplio, ya que incluye el papel fundamental en los cambios a nivel molecular y genético que tienen determinados componentes de la dieta. Se trata de los componentes bioactivos, o aquellos compuestos, esenciales y no esenciales (p. ej., vitaminas o polifenoles) que se encuentran en la naturaleza, forman parte de la cadena alimentaria y se puede demostrar que tienen un efecto en la salud humana (140).

Del mismo modo que los alimentos que se encuentran en la naturaleza, la función de la leche humana no es "meramente calórica o energética". Más bien, la leche humana

aporta una inmensa variedad de factores con una serie de propiedades que tienen un rol profundo en la salud y la supervivencia del bebé. Estos componentes provienen, bien del plasma materno, o bien de la propia glándula mamaria.

Además de las múltiples propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras que compensan las deficiencias del sistema inmunológico del recién nacido (139), otra gran variedad de compuestos bioactivos están presentes en la leche humana madura, con una enorme diversidad funcional, como se resume en la revisión de Ballard et al (138):

- Células; fundamentalmente macrófagos, con capacidad inmunomoduladora y protectora frente a infecciones; pero también células madre con supuesta función de programación celular.
- Inmunoglobulinas (IgA, IgG, IgM)
- Citoquinas (IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ) y quimiocinas (G-CSF); fundamentales en la comunicación entre células y sistemas
- Factores de crecimiento (Factor de Crecimiento Endotelial Vascular -VEGF-, Factor de Crecimiento Epidérmico -EGF-, Factor de Crecimiento Neurológico -NGF-, eritropoyetina); con numerosos efectos a nivel del tracto intestinal, a nivel de proliferación vascular, proliferación neuronal, prevención de la anemia y sistema endocrino.
- Hormonas (calcitonina, somatostatina); con importantes funciones en la regulación del crecimiento.
- Agentes antimicrobianos (lactoferrina); con un amplio espectro antibacteriano, antivírico y antifúngico.
- Hormonas metabólicas (adiponectina, leptina)
- Oligosacáridos (Oligosacáridos de Leche Humana -HMOS-, gangliósidos, glicosaminoglicanos); que actúan como agentes prebióticos e influyen en la colonización intestinal del recién nacido.

1.4.2.1. Antioxidantes en la leche materna

Uno de los componentes bioactivos más importantes en la leche materna es su contenido en antioxidantes. Ya en 1988, un estudio demuestra la capacidad reductora del calostro humano al añadirlo a una muestra de leucocitos polimorfonucleares humanos, así como una disminución en la producción de ROS, como el H₂O₂ por parte de los leucocitos en presencia de calostro. Además, en ese mismo estudio, se observa una supresión en la actividad de enzimas productoras de ROS (mieloperoxidasa, lisozimas) (141). Todo ello demuestra un efecto protector antiinflamatorio de la leche humana, concretamente, del calostro.

Posteriormente, se han identificado las enzimas antioxidantes y los componentes antioxidantes no enzimáticos de la leche materna. Así, en la leche materna se ha podido identificar actividad enzimática de SOD, GPx y CAT. Además, a lo largo de la lactancia, la actividad de SOD aumenta, sobretodo en la leche de madres con recién nacidos a término. Sin embargo, la actividad de la GPx disminuye a lo largo de la lactancia (142).

Respecto a los antioxidantes no enzimáticos identificados en la leche materna, destacan la lactoferrina, GSH, arginina, citrulina, taurina, creatina, selenio, zinc, vitamina C, β-caroteno, coenzima Q10, vitaminas E y A. La vitamina E, los carotenoides y la coenzima Q10, pueden tomar el papel de eliminadores de radicales en la fase lipídica, mientras que la vitamina C actúa en la fase acuosa. La transferencia placentaria de vitaminas A y E es limitada durante toda la gestación, por lo que la única fuente de estas moléculas antioxidantes para el recién nacido es la leche materna (143).

Los antioxidantes lipofílicos abundan sobretodo en el calostro, y disminuyen tal cual avanza la lactancia materna. De hecho, el nivel promedio de vitamina A en el tercer día post-parto puede ser tres veces mayor que el de la leche madura (144).

De forma global, la capacidad antioxidante total de la leche materna es mayor en el calostro, así como un mayor nivel de estrés oxidativo en el recién nacido post-parto. Esta

capacidad antioxidante disminuye a lo largo del periodo de lactancia, paralelamente a la maduración de los sistemas antioxidantes propios del bebé (145,146).

1.4.2.2. Melatonina en la leche materna

El triptófano en leche materna, precursor de la melatonina, tiene propiedades antioxidantes demostradas en la propia leche materna, e incluso al añadirlo externamente a las fórmulas de vaca (147).

La primera descripción del contenido de melatonina en la leche materna fue en 1993, mediante la recogida de muestras de leche materna entre el segundo y tercer día post-parto, a un total de 10 madres y en diferentes momentos del día, con tal de esclarecer la ritmicidad en la secreción de melatonina mediante radioinmunoanálisis. Se objetiva así, por primera vez, que la melatonina en la leche materna muestra un ritmo circadiano, al igual que en el plasma, siendo los valores diurnos prácticamente indetectables, al contrario que las concentraciones nocturnas de melatonina (148). Esta ritmicidad horaria se demuestra también en otro pequeño estudio, con las secreciones nocturnas de triptófano en leche materna y de 6-sulfatoximelatonina en orina de recién nacidos alimentados exclusivamente al pecho (el metabolito de la melatonina excretado en orina), siguiendo este último un ritmo paralelo al primero (149).

La melatonina en la leche materna es la principal fuente de información cronobiológica al recién nacido. Al estudiar los parámetros de calidad de sueño en recién nacidos mediante el uso de actígrafos, la calidad del sueño es mejor en los recién nacidos alimentados al pecho exclusivamente(149). Además de influir en la calidad del sueño del bebé, también reduce significativamente los episodios de irritabilidad y cólicos del lactante, al comparar lactantes alimentados exclusivamente con leche materna y niños alimentados con fórmula (describiendo también las concentraciones de melatonina en leche materna en un pequeño extracto de la muestra del estudio, objetivando también un ritmo circadiano claro) (150).

La ritmicidad en el contenido de melatonina en la leche materna con niveles prácticamente indetectables durante el día, al igual que ocurre en el plasma, está descrita de forma general en diferentes estudios, pero existen diferencias, bien en el mantenimiento de dicha ritmicidad horaria, o bien en la variabilidad de contenido en melatonina, dependiendo de algunas circunstancias estresantes que actuarían como mecanismos inflamatorios o pro-oxidantes (tipo de parto, antecedente de mastitis, u otros) (62,63,151).

Por lo tanto, la presencia de ritmicidad horaria de la melatonina en leche materna indica la variabilidad que presenta la composición de la leche materna a lo largo del día, adaptándose a las necesidades del lactante, lo cual ocurre también con otros componentes como proteínas o vitaminas (152,153). Los análisis de la leche humana extraída, que previamente se ha conservado congelada, muestran estabilidad en el contenido de melatonina durante incluso 24 horas tras la descongelación, por lo que la administración de leche materna extraída respetando los horarios de extracción, en los casos en que la alimentación al pecho directo no es posible, podría optimizarse (154).

En el contexto de alimentación del recién nacido respetuosa con los ritmos circadianos, queda por dilucidar si el estrés oxidativo secundario a las circunstancias inflamatorias que rodean al parto, puede influir en la secreción de melatonina y con ello, alterar la calidad antioxidante de la lactancia materna.

Papel de la melatonina en la capacidad antioxidante del calostro y leche humana madura.

Diferencias entre parto vaginal y parto por cesárea.

JUSTIFICACIÓN

2. JUSTIFICACIÓN

Los fenómenos de estrés oxidativo que rodean al parto pueden incrementarse bajo determinadas circunstancias como la práctica de una cesárea. Las consecuencias de este aumento de estrés oxidativo en el recién nacido no están claras.

Dado que el recién nacido tiene un sistema antioxidante inmaduro, la adecuada suplementación externa mejora su estatus antioxidante, especialmente bajo condiciones pro-oxidantes. La principal fuente de antioxidantes en la época perinatal es la leche materna, especialmente el calostro.

Estudios recientes demuestran el papel como protector antioxidante de la melatonina. Sin embargo, no se sabe si la secreción fisiológica de melatonina podría ser suficiente para ejercer su papel como antioxidante.

Existe una falta de estudios sobre la descripción de la secreción de melatonina en la leche materna en condiciones de normalidad. Así, se establece una necesidad sobre el conocimiento de la secreción normal de melatonina y su influencia en la capacidad antioxidante total en leche materna, bajo diferentes circunstancias de parto.

Papel de la melatonina en la capacidad antioxidante del calostro y leche humana madura.

Diferencias entre parto vaginal y parto por cesárea.

HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

Existen diferencias en la capacidad antioxidante de la leche materna en función del tipo de parto. Estas diferencias están influenciadas por el contenido de melatonina en la leche materna.

Papel de la melatonina en la capacidad antioxidante del calostro y leche humana madura.

Diferencias entre parto vaginal y parto por cesárea.

OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4. 1. OBJETIVO PRIMARIO

Valorar si existen diferencias en el contenido de melatonina en la leche humana, así como en su capacidad antioxidante, tanto en calostro como en el resto de fases de la lactancia materna durante el primer mes tras el nacimiento, en función del tipo de parto: vaginal o cesárea no urgente.

4. 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Describir la cronología de aparición de ritmo circadiano en la secreción de melatonina en leche materna en el primer mes tras el parto.
- Validar un método de determinación de melatonina en calostro y leche materna madura.
- Determinar la capacidad antioxidante en la leche materna dependiendo del tipo de parto.
- Determinar el contenido en biomarcadores de estrés oxidativo en la leche materna dependiendo del tipo de parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. TIPO DE ESTUDIO

Estudio observacional de cohortes, prospectivo, a lo largo del periodo comprendido entre enero 2016 y mayo 2017.

5.2. POBLACIÓN A ESTUDIO

La población diana del estudio fueron madres lactantes, que habían dado a luz a recién nacidos a término, sanos, alimentados con leche materna exclusivamente, sin antecedentes de patología gestacional ni perinatal

5.3. CRITERIOS DE SELECCIÓN

5.3.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- Leche materna procedente de mujeres puérparas sanas con recién nacidos sanos, producto de partos a término, procedentes de las Salas de Maternidad del Hospital Dr. Peset de Valencia o del Hospital Quirón de Valencia
- Debían cumplirse los siguientes criterios:
 - Recién nacidos con peso adecuado a la edad gestacional
 - Antecedente de parto vía parto vaginal o cesárea electiva
 - Recién nacidos alimentados exclusivamente con lactancia materna
 - Mujeres que acepten participar firmando el consentimiento informado

5.3.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- Partos mediante cesárea urgente
- Partos a edad gestacional menor de 37 semanas
- Recién nacidos con peso al nacimiento inferior a 2500 gramos

- Apgar <5 a los 5 minutos o pH de calota < 7,10 o exploración neurológica patológica las primeras 8 horas de vida
- Administración de FiO₂ > 21% al recién nacido en cualquier momento desde el nacimiento
- Sospecha prenatal de retraso del crecimiento intrauterino según criterios estadísticos de normalidad para las curvas poblacionales específicas y/o alteraciones en el estudio Doppler de la arteria umbilical o circulación fetal
- Cualquier estado hipertensivo del embarazo según criterios estandarizados
- Diabetes gestacional
- Tabaquismo
- Antecedente de infección bacteriana en el tercer trimestre
- Madres con antecedente de trastorno del sueño durante la gestación, según criterios diagnósticos estandarizados
- Madres que hayan ejercido su actividad laboral durante la franja horaria nocturna en el tercer trimestre, o estén ejerciendo dicho tipo de trabajo tras el parto
- Patología neonatal tipo distrés respiratorio y/o sepsis en las primeras 24 horas de vida
- Administración de cualquier suplemento alimentario que no sea leche materna
- Tratamiento materno con fármacos antidepresivos, antipsicóticos, hormona tiroidea o antiinflamatorios esteroideos
- Domicilio habitual sito a una distancia mayor de 10 km de diámetro del Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Pediatría de la Universidad de Valencia.

5.4. TAMAÑO MUESTRAL

Tomando como base, las posibles diferencias en la secreción de melatonina (pg/ml) en el calostro materno nocturno, se tomó como referencia la media y desviación estándar de la secreción pico nocturna de melatonina encontrada en leche materna de 11 madres sanas que parieron por parto vaginal, descrita por Pontes et al (63).

Aplicando la fórmula que se describe a continuación,

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \cdot S^2}{d^2}$$

donde

Z_{α} : 1.960; que corresponde al valor Z correspondiente a aceptar un error $\alpha = 0.05$

Z_{β} : 2.326; que corresponde al valor Z correspondiente a aceptar un error $\beta = 0.01$

S^2 : 11.49; que se corresponde a la varianza o cuadrado de la desviación estándar de la media de melatonina nocturna en leche materna que tiene el grupo control o de referencia, que es de 3.39 pg/ml (63).

d^2 : que corresponde al valor de la diferencia mínima esperable, que se establece en 5 mg/dL, valor orientativo, superior a la desviación estándar descrita en el estudio de Pontes et al.

5.5. VARIABLES

La recogida de datos se realizó una vez aceptadas las condiciones del estudio y firmado el consentimiento correspondiente.

Las variables que se recogieron fueron:

- Variables en leche materna:
 - Contenido de melatonina en la leche materna
 - Parámetros analíticos de inflamación según se detalla a continuación
 - Parámetros analíticos de estrés oxidativo según se detalla a continuación
 - Parámetros analíticos para determinar la capacidad antioxidante de la leche materna
- Variables perinatales:
 - Edad materna en el momento del parto
 - Edad gestacional en el momento del parto
 - Tipo de parto, distinguiendo si se trata de parto vaginal o cesárea no urgente
 - Peso al nacimiento
 - pH de arteria umbilical
 - Horario de extracción de las muestras diurnas y nocturnas

5.5.1. VARIABLES PRINCIPALES

Las variables principales estudiadas en leche materna fueron, por un lado, el contenido de melatonina en leche materna, y por otro lado, los parámetros de inflamación y metabolismo oxidativo:

- Melatonina, expresado en pg/mL
- IL6, TNF α , IFN γ , expresado en pg/mL
- Daño oxidativo a proteínas, grupos carbonilo, expresado en nmol/mg de proteína.

- Capacidad antioxidante total, expresado en mmol equivalentes de Trolox

5.5.2. VARIABLES SECUNDARIAS

Las variables secundarias fueron los datos referentes tanto al recién nacido como a las madres.

- Tipo de parto, distinguiendo si se trata de un parto vaginal o de una cesárea no urgente
- El peso se expresó en kilogramos. Se aplica la clasificación estadística estándar basada en los percentiles poblacionales para edad gestacional y sexo del Estudio Transversal Español de Crecimiento, 2008 (155)
- pH arteria umbilical. Recogida de 1 mL de sangre con jeringa estéril procedente de arteria umbilical tras el momento del parto y procesada por analizador de gases con resultado inmediato, © ABL90 FLEX, Radiometer

5.6. METODOLOGÍA

El estudio recogió datos dentro del periodo comprendido en el primer mes de vida del recién nacido.

Todas las madres fueron informadas verbalmente y por escrito. Las condiciones referentes a los procedimientos fueron aceptadas por parte de la madre y/o tutor del recién nacido mediante la firma del correspondiente consentimiento informado.

Se recogieron medidas antropométricas de la madre y el recién nacido en una hoja de registro previamente diseñada, garantizando la confidencialidad de los datos en todo momento.

- Identificación del caso, seguido de un número de 1 a 25 para cada uno de los grupos, por orden de reclutamiento
- Día, hora, lugar de nacimiento
- Día, hora de recogida de muestras
- Peso, sexo y edad gestacional del recién nacido

Recogida de muestras:

- Total de muestras necesarias de leche materna: Se recogieron 2 muestras por sujeto los días 1, 3 y 30 post-parto. Se recogieron dos muestras en dos momentos del día para cada madre (entre las 12 y 2 p.m., para las muestras diurnas, y las 12 y las 2 a.m. para las muestras nocturnas), por lo que se recogieron en total 6 muestras de leche materna por cada madre participante.
- Lugar de recogida: La recogida de muestras se realizó durante la hospitalización de las madres para el calostro y leche de transición, dependiendo de la duración de la estancia en el hospital, determinada por los protocolos obstétricos habituales (al menos 48 horas de hospitalización en caso de parto vaginal o al menos 72 horas de hospitalización en caso de parto por cesárea). Para el resto de muestras

(fundamentalmente las muestras de transición nocturna en caso de partos vaginales, o las muestras de leche humana madura), la extracción se realizó en el domicilio.

- Procedimiento de recogida y transporte. Se instruyó a todas las participantes en la extracción de leche materna, tanto manual como con el sacaleches, durante su hospitalización, por parte de la Consultora Internacional de Lactancia Materna del equipo de pediatría del hospital (IBCLC, o International Board Certified Lactation Consultant). Las muestras se recogieron mediante masaje manual o sacaleches eléctrico y bajo estrictas condiciones de higiene, que consistieron en retirada de joyas y esmaltes de uñas, lavado de manos hasta los codos con agua y jabón, así como uso de material fungible estéril en caso de precisar extracción eléctrica con sacaleches. Tras su recogida, se conservaron en congelador a -20°C un máximo de 48 horas previo a su traslado, manteniendo las condiciones de frío, hasta el Laboratorio de Bioquímica del Departamento de Pediatría y Obstetricia de la Universidad de Valencia, donde se almacenaron congeladas a una temperatura de -80°C hasta su procesamiento. Se facilitó a todas las madres participantes neveras portátiles, así como acumuladores de frío para neveras portátiles en el momento del alta hospitalaria. Todas las muestras nocturnas se recogieron en condiciones de luz tenue amarillenta, a una distancia mínima de 2 metros del foco de luz, y se almacenaron en recipientes cubiertos con papel opaco hasta su procesamiento final.
- Procesamiento de la leche humana para el análisis bioquímico:
 - El contenido de melatonina en la leche materna se midió utilizando el kit estándar de ensayo de inmunoadsorción enzimática (ELISA) (DRGMelatonin ELISA-EIA-1431; DRG International Inc., Springfield, NJ) y se midió en pg/ml. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con

las instrucciones del fabricante mediante descongelación total y delipidación después de centrifugación a 1500 rpm. Se incubaron 100 µl de leche materna delipidada junto con el anticuerpo primario y la solución de sustrato tampón 3,3',5,5' tetrametilbenzidina (TMB) en condiciones de oscuridad, a 500 rpm durante 3 minutos. En segundo lugar, la lectura colorimétrica de la absorbancia se llevó a cabo utilizando placas VICTOR Multilabel Plate Reader (Waltham Massachusetts, EE. UU.) a 450 nm versus control de filtro a 595 nm.

- Interleucina 6 (IL6), Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α), Interferón Gamma (IFN γ), expresado en pg/mL. Luminex Map Technology LabScan 100 system (Luminex Austin TX USA) y Milliplex MAP human high sensitivity T cell panel-immunology multiplex assay catalog number HSTCMAG-28 SK para TNF- α , IL-6 INF- γ (Merck Millipore, Burlington MA, USA).
- Daño oxidativo a proteínas, mediante la determinación de grupos carbonilo, según el método descrito por Levine et al expresado en nmol/mg de proteína(156).
- Capacidad antioxidante total, expresado en mmol equivalentes de Trolox Método descrito por Brand-Williams modificado por Gombert et al 2018 mediante 2,2-Difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) (157).

5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS para Windows versión 22.0 (Inc., Chicago USA)

Se utilizó una probabilidad (p) < 0,05 para definir significancia estadística.

Se comprobó la normalidad en la distribución de la muestra mediante el test de Kolmogorov – Smirnov. Tras comprobar una distribución muy asimétrica, y por lo tanto

muy alejada de la distribución normal, se utilizaron herramientas estadísticas no paramétricas.

Se realizaron varios tipos de análisis según se describe a continuación:

1. Descripción y comparación entre medianas de las variables principales según tipo de parto.

En primer lugar, se compararon los valores de las diferentes variables cada día y momento del día, para cada tipo de parto por separado. La descripción de los datos se realizó con la mediana y los cuartiles inferior y superior (percentiles del 25% y del 75%). Las comparaciones se realizan con la suma de rangos de Wilcoxon.

2. Cambios de las variables en los días 3 y 30 respecto al primer día.

En segundo lugar, con el objetivo de encontrar si alguna de las variables estudiadas evolucionó de un modo distinto según el tipo de parto a lo largo del mes de vida, se observó la evolución que experimenta cada variable al día 3 y al día 30 respecto al día 1. Estas evoluciones o cambios se midieron distinguiendo entre las mediciones tomadas por el día y las tomadas por la noche. La descripción se realizó con la mediana y los cuartiles. Se realizaron dos tipos de comparaciones: las comparaciones intra-grupos y las comparaciones entre grupos. Las comparaciones intra-grupos se centraron en los cambios que se produjeron dentro de cada grupo por separado (vaginal o cesárea). Por otro lado, las comparaciones entre grupos se centran en comparar el grupo de recién nacidos tras parto vaginal con el grupo de recién nacidos tras parto por cesárea. Estas comparaciones se realizaron con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon.

3. Cambios de las variables a lo largo del día.

En tercer lugar, se describieron los cambios que experimentó cada variable a lo largo del día (es decir, día versus noche). Estos cambios se midieron por separado para el día 1, 3 y 30. Al igual que en el punto anterior la descripción se realizó con

la mediana y los cuartiles. Del mismo modo que en el punto anterior, se realizaron dos tipos de comparaciones: las comparaciones intra-grupos y las comparaciones entre grupos. Estas comparaciones se realizaron con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon

4. Correlaciones con los valores de melatonina.

Finalmente, con el objetivo de observar la relación y tipo de asociación existente entre la melatonina y cada una de las variables, se calcularon las correlaciones de Spearman. Las correlaciones se calcularon para cada momento de la lactancia, momento del día y tipo de parto. Del mismo modo, se estudiaron también las correlaciones entre las variaciones que presentaron los valores de melatonina y el resto de variables desde el primer día, al día 3 y 30, así como las variaciones a lo largo del día (entre el día y la noche). Las correlaciones con valores de R fuertes o muy fuertes se consideran válidas.

RESULTADOS

6. RESULTADOS

Se analizaron un total de 126 muestras de leche materna procedentes de 21 mujeres que parieron vía vaginal, así como 102 muestras de leche materna procedentes de 17 mujeres que parieron por cesárea electiva. No se encontraron diferencias en las características generales de las mujeres participantes entre ambos grupos, según se especifica en la tabla siguiente.

Tabla 1. Comparación de las características generales de las mujeres participantes (edad materna, índice de masa corporal, edad gestacional, peso al nacimiento, pH de arteria umbilical)

	Parto vaginal (n=21)	Parto por cesárea (n=17)	p
Edad materna	33 (28-37)	33 (28-38)	0.837
Índice masa corporal	23 (21-24)	23 (22-24)	0.592
Edad gestacional	40 (39-40)	39 (38-40)	0.210
Peso al nacimiento	3.320 (3.120-3.660)	3.200 (2.990-3.700)	0.370
pH arteria umbilical	7.26 (7.24-7.33)	7.32 (7.22-7.33)	0.433

Tabla 1. Los valores corresponden a la mediana y los cuartiles inferiores y superiores (percentil 25 y percentil 75).

6.9.1. Descripción y comparación de las medianas de las variables principales según el tipo de parto.

Inicialmente, se compararon cada una de las variables principales diferenciadas según el momento de la lactancia, así como el momento del día, correspondientes a parámetros de inflamación, estrés oxidativo y melatonina en leche materna, en función del tipo de parto (Tabla 1).

- 1.1. Marcadores inflamatorios. De forma global, existen diferencias en los parámetros inflamatorios en las muestras diurnas tanto de calostro como de leche de transición, encontrando mayor contenido en el grupo de cesáreas, sobre todo para la IL6 y el TNF- α , sin ser estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 2; Figura 2; Figura 3).

Tabla 2. Comparación del contenido en IL6, TNF- α e IFN γ en leche materna en función del tipo de parto y del momento de lactancia. Día y noche.

Variable	Momento	Día	Vaginal	Cesárea	p
IL6 (pg/ml)	Día	1	0,01 (0,00; 23,7)	14,10 (0,01; 33,3)	0,418
		3	0,50 (0,00; 4,92)	2,47 (0,01; 10,2)	0,247
		30	0,18 (0,00; 6,66)	0,18 (0,05; 4,03)	0,839
	Noche	1	0,01 (0,01; 3,73)	5,18 (0,01; 10,3)	0,181
		3	4,48 (0,01; 8,98)	1,41 (0,01; 12,1)	1,000
		30	0,18 (0,01; 5,03)	0,18 (0,01; 0,81)	0,848
TNF- α (pg/ml)	Día	1	0,01 (0,01; 9,34)	8,73 (0,01; 19,9)	0,302
		3	3,27 (0,01; 10,5)	7,69 (0,01; 13,8)	0,390
		30	0,43 (0,01; 2,68)	1,52 (0,05; 2,31)	0,553
	Noche	1	0,01 (0,01; 20,6)	7,92 (0,01; 15,0)	0,697
		3	8,16 (0,01; 19,7)	3,32 (0,01; 9,7)	0,415
		30	1,69 (0,01; 3,56)	0,43 (0,01; 3,49)	0,966
IFN γ (pg/ml)	Día	1	0,01 (0,01; 0,61)	0,18 (0,01; 0,61)	0,342
		3	0,61 (0,01; 0,61)	0,61 (0,01; 0,61)	0,714
		30	0,54 (0,01; 0,61)	0,61 (0,03; 0,61)	0,620
	Noche	1	0,01 (0,01; 0,61)	0,53 (0,01; 0,61)	0,609
		3	0,61 (0,01; 0,61)	0,21 (0,01; 0,61)	0,617
		30	0,61 (0,01; 0,61)	0,61 (0,01; 0,61)	0,303

Tabla 2. Los valores corresponden a la mediana y los cuartiles inferiores y superiores (percentil 25 y percentil 75). Los momentos de la lactancia estudiados corresponden a los días 1, 3 y 30 tras el nacimiento (1, calostro; 3, leche de transición; 30, leche madura).

Figura 2. Gráfica de cajas y bigotes para la representación de la comparación de las diferencias en el contenido de IL-6 en función del tipo de parto y del momento de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura). Día y noche.

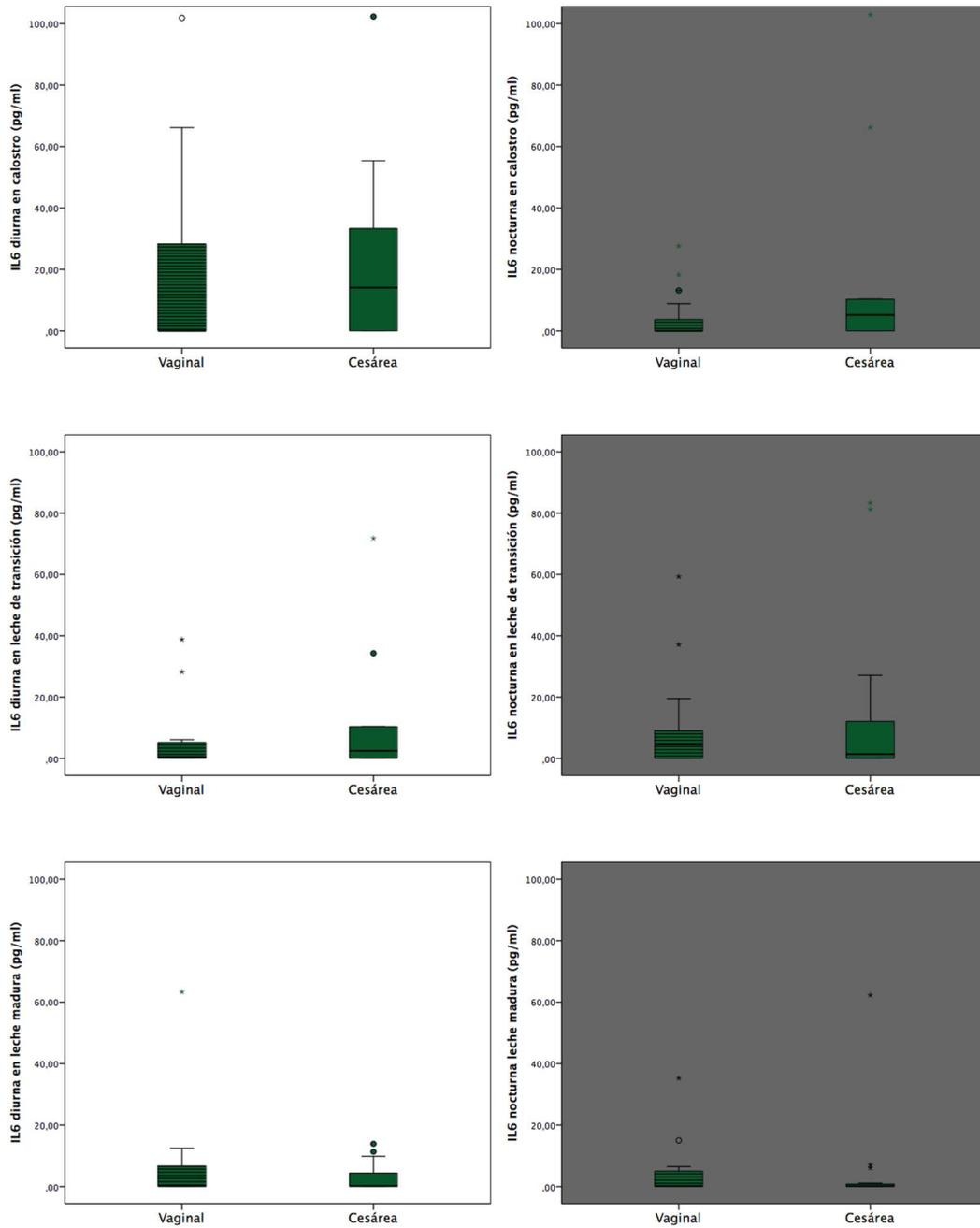
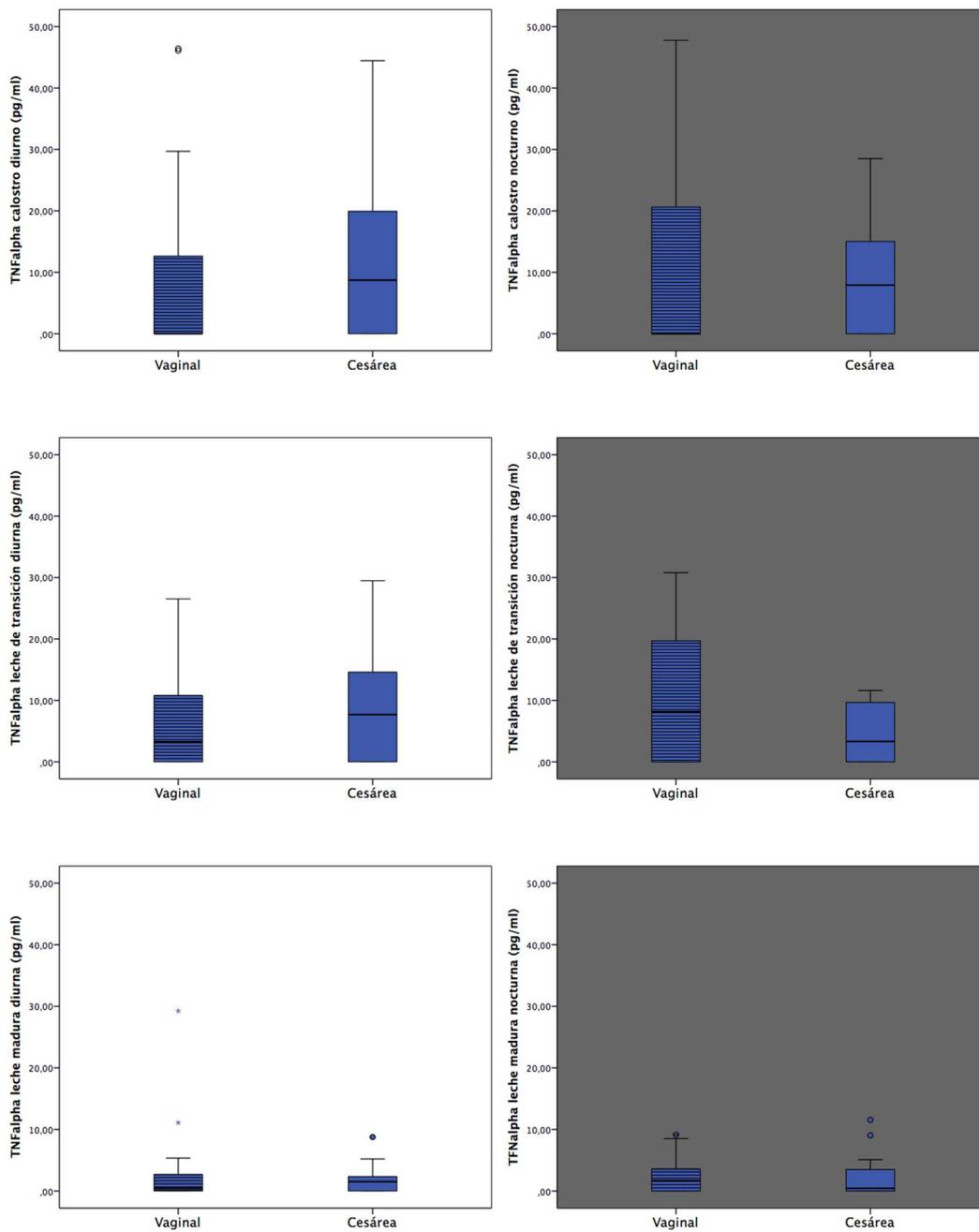


Figura 3. Gráfica de cajas y bigotes para la representación de la comparación de las diferencias en el contenido de TNF- α en función del tipo de parto y del momento de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura). Día y noche.



1.2. Metabolismo oxidativo.

- 1.2.1. Daño oxidativo a proteínas: grupos carbonilo. En lo que a indicadores de estrés oxidativo se refiere, el contenido en grupos carbonilo o daño oxidativo a proteínas es mayor en la leche madura nocturna procedente de madres tras parto por cesárea (7040 nmol/mg proteína versus 4620 nmol/mg proteína; $p = 0,029$) (Tabla 3; Figura 4).
- 1.2.2. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la capacidad antioxidante de la leche materna mediante la medición del DPPH en las muestras diurnas de los días 1 y 3 entre grupos. El contenido en DPPH es mayor en el calostro de madres que parieron por cesárea, con niveles cercanos a la significación estadística (344 mmol equivalentes Trolox versus 152 mmol equivalentes Trolox; $p = 0,053$). Este contenido en DPPH es, sin embargo, mayor en las muestras de leche de transición diurna de las madres que parieron vía vaginal (270 mmol equivalentes Trolox versus 187 mmol equivalentes Trolox; $p = 0,037$) (Tabla 3; Figura 5).

Tabla 3. Comparación del estudio del metabolismo oxidativo en leche materna (contenido en grupos carbonilo y DPPH) en función del tipo de parto y del momento de lactancia. Día y noche.

Variable	Momento	Día	Vaginal	Cesárea	P
Carbonilos (nmol/mg pr)	Día	1	9900 (7810, 17050)	11440(10450, 21340)	0,573
		3	8800 (3960, 10615)	7700 (4290, 10340)	0,940
		30	3630 (1925, 7590)	5280 (3410, 6050)	0,565
	Noche	1	11220(9570, 13420)	9460 (8690, 15180)	0,775
		3	8910 (6105, 12210)	7590 (6490, 9515)	0,439
		30	4620 (2640, 6710)	7040 (6820, 8360)	0,029
DPPH (mmol/Trolox)	Día	1	152 (31,0, 304)	344 (212, 432)	0,053
		3	270 (209, 392)	187 (53,6, 259)	0,037
		30	152 (72,6, 265)	186 (128, 302)	0,454
	Noche	1	135 (0,00, 362)	279 (164, 403)	0,246
		3	204 (135, 250)	197 (75,0, 271)	0,937
		30	204 (169, 329)	192 (151, 269)	0,695

Tabla 3. Los valores corresponden a la mediana y los cuartiles inferiores y superiores (percentil 25 y percentil 75). Los momentos de la lactancia estudiados corresponden a los días 1, 3 y 30 tras el nacimiento (1, calostro; 3, leche de transición; 30, leche madura).

Figura 4. Gráfica de cajas y bigotes para la representación de la comparación de las diferencias en el contenido en grupos carbonilo en función del tipo de parto y del momento de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura). Día y noche.

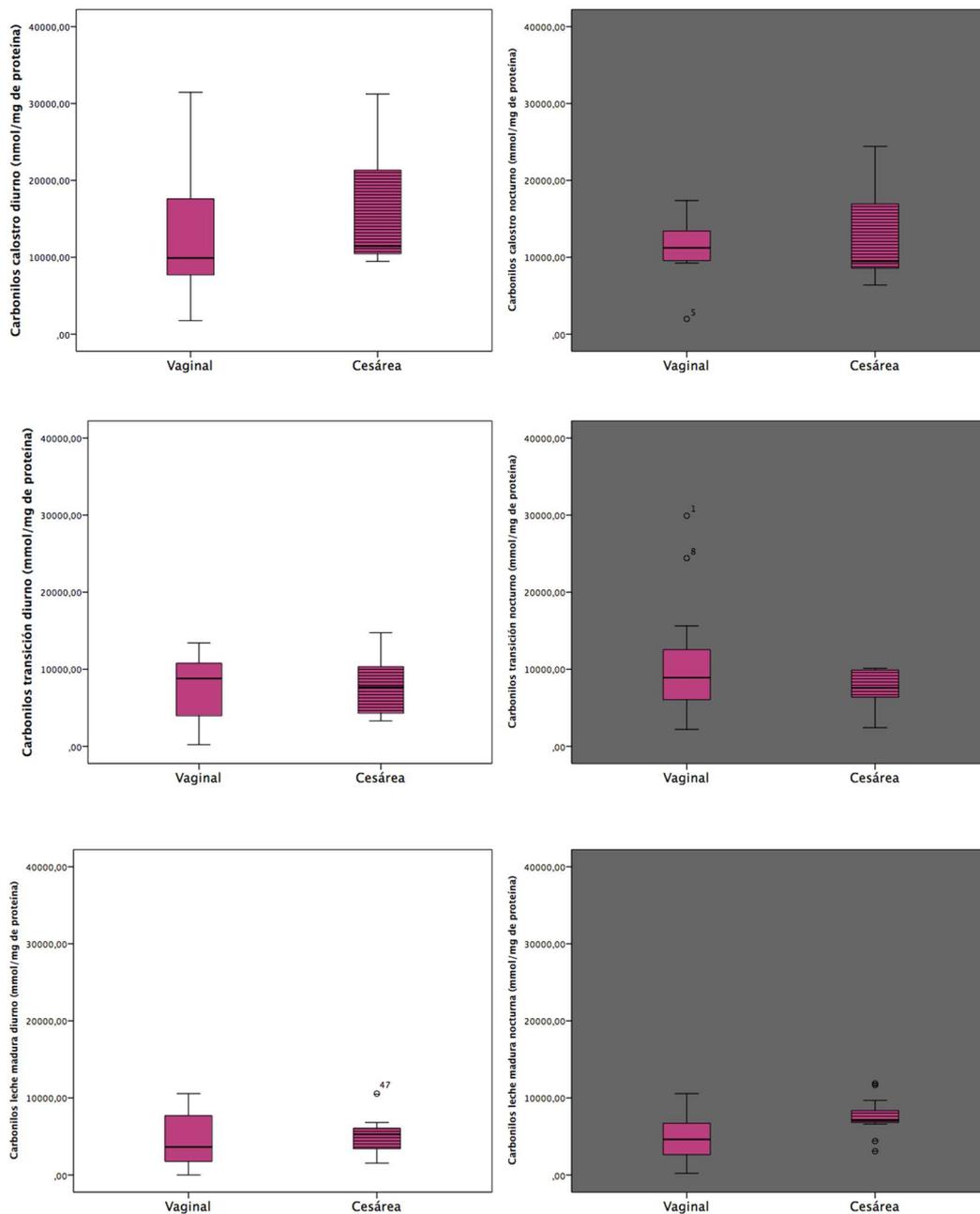
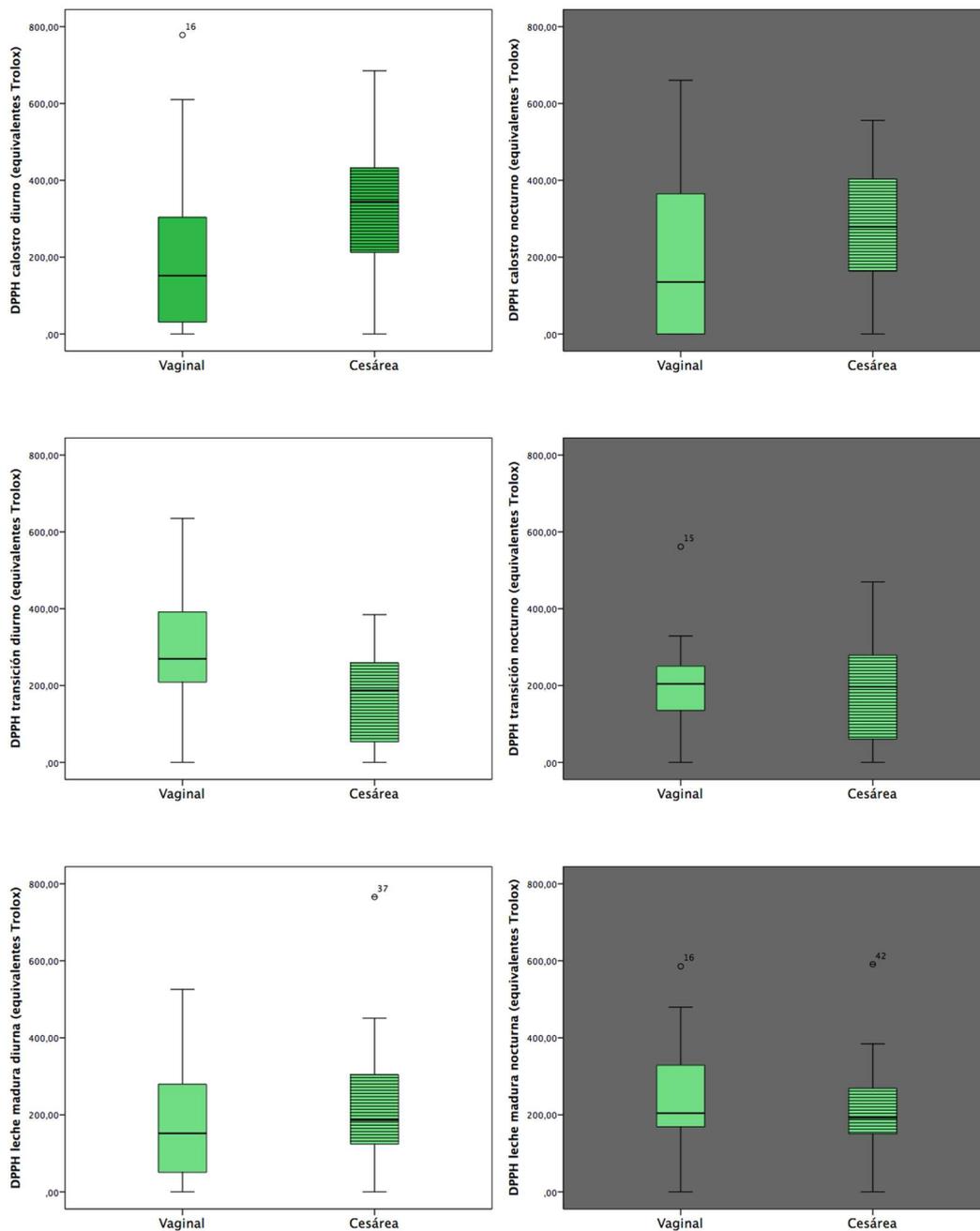


Figura 5. Gráfica de cajas y bigotes para la representación de la comparación de las diferencias en la capacidad antioxidante en la leche materna en función del tipo de parto y del momento de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura). Día y noche.



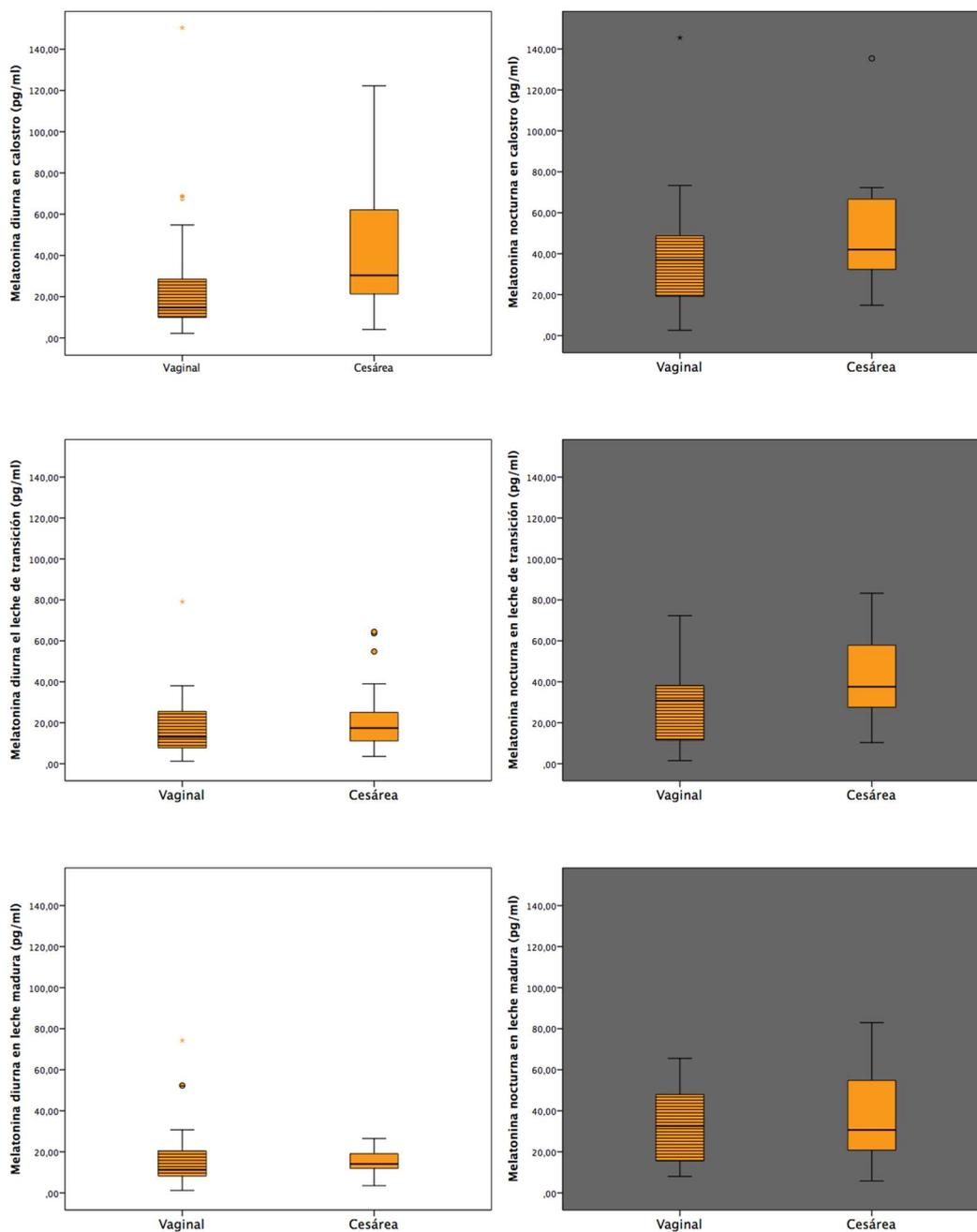
1.3. Melatonina. El contenido de melatonina en el calostro es mayor en las muestras diurnas del grupo de cesáreas (30,3 pg/ml versus 14,7 pg/ml; $p = 0,020$) (Tabla 4; Figura 6).

Tabla 4. Comparación del contenido en melatonina en leche materna en función del tipo de parto y del momento de lactancia. Día y noche

Variable	Momento	Día	Vaginal	Cesárea	P
Melatonina (pg/ml)	Día	1	14,7 (9,9 : 28,5)	30,3 (21,4; 60,2)	0,020
		3	13,1 (7,71; 25,6)	17,4 (11,1; 25,0)	0,425
		30	11,2 (8,20; 20,4)	14,1 (11,9; 19,1)	0,502
	Noche	1	36,9 (19,1; 48,7)	42,0 (32,3; 66,7)	0,111
		3	30,8 (12,4; 37,8)	37,6 (28,0; 54,2)	0,091
		30	32,6 (15,6; 47,9)	30,6 (20,9; 53,5)	0,873

Tabla 4. Los valores corresponden a la mediana y los cuartiles inferiores y superiores (percentil 25 y percentil 75). Los momentos de la lactancia estudiados corresponden a los días 1, 3 y 30 tras el nacimiento (1, calostro; 3, leche de transición; 30, leche madura).

Figura 6. Gráfica de cajas y bigotes para la representación de la comparación de las diferencias contenido de melatonina en la leche materna en función del tipo de parto y del momento de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura). Día y noche.



6.9.2. Cambios de las variables estudiadas en leche materna en los días 3 y 30 respecto al primer día.

Se compararon los tipos de variación que experimentaba cada variable al tercer y 30 día respecto al primer día. Es decir, se buscaron diferencias en la forma de progresar o evolucionar cada variable estudiada a lo largo de las tres fases de lactancia estudiadas (calostro, transición, leche madura).

- 2.1. Marcadores inflamatorios. Existe una progresión descendiente en el contenido de algunos marcadores inflamatorios (IL 6 y TNF α) a lo largo de la lactancia cuando se trata de partos por cesárea: es decir, existe un descenso significativo en el contenido en IL6 y TNF α de las muestras diurnas de leche madura tras cesárea, respecto al de las muestras diurnas de calostro tras cesárea. Dicho descenso progresivo se observa también para las mismas variables en las muestras nocturnas, sin ser estos resultados estadísticamente significativos. Estas variaciones en los parámetros inflamatorios no se observan en ninguna de las fases de la lactancia cuando se trata de partos vaginales (Tabla 5).

Tabla 5. Comparación de la evolución que experimenta el contenido en IL-6, TNF- α e IFN γ en la leche materna del tercer y treinta días tras el parto, respecto al del calostro, en función del tipo de parto y del momento de lactancia. Día y noche.

Variable	Momento	Día	Parto vaginal	p ¹	Cesárea	p ¹	p ²
IL6	Día	3	0,01(-8,06;2,69)	0,398	-1,85(-16,1 2,02)	0,328	0,870
		30	0,01 (0,01, 4,78)	0,969	-7,96(-18,8 0,05)	0,052	0,153
	Noche	3	2,14 (0,01, 5,34)	0,124	0,01(-7,42; 7,53)	0,554	0,316
		30	0,01 (0,01, 1,12)	0,689	-4,02(-8,50, 0,05)	0,062	0,134
TNF- α	Día	3	0,01 (0,01, 4,76)	0,266	0,01(-12,9, 8,50)	1,000	0,573
		30	0,01(-0,56, 0,88)	0,666	-9,08(-19,3, 0,41)	0,035	0,363
	Noche	3	0,01(-13,0, 8,16)	0,780	0,01(-5,95, 0,43)	0,205	0,750
		30	0,01(-5,19, 1,54)	0,350	-4,00(-14,8, 0,11)	0,062	0,302
IFN γ	Día	3	0,01 (0,01, 0,61)	0,893	0,01 (-0,32, 0,50)	0,503	0,541
		30	0,01 (0,01, 0,61)	0,075	0,01 (-0,50, 0,47)	0,402	0,339
	Noche	3	0,01 (0,01, 0,61)	0,142	0,01 (-0,40, 0,61)	0,933	0,614
		30	0,01 (0,01, 0,46)	0,357	0,01 (-0,11, 0,31)	0,584	0,945

Tabla 5. Las comparaciones se realizan con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se representan la mediana y cuartiles inferiores y superiores (percentiles 25 y 75).

p¹ corresponde a las comparaciones intragrupos (vaginal o cesárea). p² corresponde a las comparaciones intergrupo (vaginal versus cesárea).

3: evolución desde el calostro a la leche de transición; 30: evolución desde el calostro a la leche madura.

2.2. Metabolismo oxidativo.

2.2.1. Daño oxidativo a proteínas: grupos carbonilo. El contenido en grupos carbonilo experimenta un descenso estadísticamente significativo en las muestras de leche madura diurna respecto al del calostro, en el grupo de partos vaginales, lo cual no sucede en el grupo de cesáreas ($p = 0,034$) (Tabla 6).

2.2.2. Capacidad antioxidante. Respecto a la progresión de la capacidad antioxidante de la leche materna en los partos por cesárea desde el primer día, a pesar de encontrar más capacidad antioxidante en el calostro de mujeres tras parto por cesárea respecto al de mujeres tras parto vaginal, existe un decremento en la capacidad antioxidante de la leche procedente de mujeres tras cesáreas al tercer día, respecto al del contenido en el día 1 (calostro). Las comparaciones en este sentido entre grupos (vaginal versus cesárea), muestran evoluciones significativamente opuestas en la capacidad antioxidante en la leche de transición respecto al del calostro, de forma que existe un aumento de la misma cuando se trata de partos vaginales, y un descenso en el caso de leche procedente de mujeres tras cesárea ($p = 0,009$) (Tabla 6).

Tabla 6. Comparación de la evolución que experimenta el metabolismo oxidativo (contenido en carbonilos y capacidad antioxidante) en la leche materna del tercer y treinta día tras el parto, respecto al del calostro, en función del tipo de parto y del momento de lactancia. Día y noche.

Variable	Momento	Día	Vaginal	p ¹	Cesárea	p ¹	p ²
Carbonilos (nmol/mg proteína)	Día	3	-7920 (-12870; 2310)	0,219	-4730 (-6435; -3025)	0,500	1,000
		30	-7260 (-7260; -5940)	0,034	-7920 (-14300; -5720)	1,000	0,549
	Noche	3	-880 (-7700; 220)	0,219	-2640 (-8470; -2200)	1,000	0,393
		30	-3520 (-7975; -165)	0,195	-3960 (-9075; -660)	0,500	1,000
DPPH (mmol /equival Trolox)	Día	3	91,9 (-51,2; 271)	0,263	-139 (-216; -24,7)	0,003	0,009
		30	-65,7 (-292; 89,2)	0,485	-108 (-241; 66,9)	0,131	0,807
	Noche	3	4,57 (-71,1; 123)	0,727	-15,2 (-152; 102)	0,476	0,554
		30	21,8 (-10,2; 116)	0,263	-4,69 (-139; 141)	0,438	0,616

Tabla 6. Las comparaciones se realizan con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se representan la mediana y cuartiles inferiores y superiores (percentiles 25 y 75).

p¹ corresponde a las comparaciones intragrupos (vaginal o cesárea). p² corresponde a las comparaciones intergrupo (vaginal versus cesárea).

3: evolución desde el calostro a la leche de transición; 30: evolución desde el calostro a la leche madura.

- 2.3. Melatonina. Respecto a la progresión en el contenido de melatonina en la leche materna, cuando se trata de partos vaginales, se observa un descenso significativo en el contenido de melatonina diurna al día 30 respecto al día 1 ($p = 0,001$). En el caso de la leche materna tras cesáreas, el contenido en melatonina experimenta un descenso estadísticamente significativo desde el primer al tercer día, tanto en las muestras diurnas como en las nocturnas ($p = 0,016$ y $p = 0,048$). (Tabla 7)
- 2.4. Capacidad antioxidante, grupos carbonilo y melatonina. Aunque en los siguientes apartados se mostrarán los coeficientes de correlaciones entre la melatonina y el resto de variables, se representan a continuación de forma longitudinal, en las figuras 7 y 8 conjuntamente, la evolución que experimentan la melatonina y, por un lado, los parámetros de estrés oxidativo (grupos carbonilo), así como, por otro lado, la capacidad antioxidante (DPPH), tanto por el día como por la noche. Se observa mayor contenido en grupos carbonilo y melatonina en el calostro diurno tras la práctica de una cesárea, pero en las muestras nocturnas del calostro tras la práctica de una cesárea, el contenido en grupos carbonilo desciende. La evolución tanto del contenido en melatonina como el de grupos carbonilo es hacia el descenso progresivo a lo largo del primer mes, en ambos grupos, tanto por el día como por la noche.

Tabla 7. Comparación de la evolución que experimenta el contenido en melatonina en la leche materna del tercer y treinta día tras el parto, respecto al del calostro, en función del tipo de parto y del momento de lactancia. Día y noche.

Variable	Momento	Día	Vaginal	p ¹	Cesárea	p ¹	p ²
Mel. (pg/ml)	Día	3	-4,91 (26,2; 5,31)	0,137	-5,9 (-39,2; -0,56)	0,016	0,394
		30	-6,11 (-19,1; 3,82)	0,010	-17,20 (-40,0; -1,99)	0,578	0,302
	Noche	3	-9,10 (-5,5; 3,02)	0,076	-10,6 (-28,9; -2,39)	0,048	0,746
		30	-0,37 (-27,7; 19,9)	0,609	-14,9 (-25,1; 2,12)	0,148	0,449

Tabla 7. Las comparaciones se realizan con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se representan la mediana y cuartiles inferiores y superiores (percentiles 25 y 75).

p¹ corresponde a las comparaciones intragrupos (vaginal o cesárea). p² corresponde a las comparaciones intergrupo (vaginal versus cesárea).

3: evolución desde el calostro a la leche de transición; 30: evolución desde el calostro a la leche madura.

Figura 7. Representación conjunta de la evolución del contenido en melatonina (pg/ml) y de la capacidad antioxidante en leche materna (expresado en mmol x 10) en función del tipo de parto, a lo largo del primer mes de lactancia.

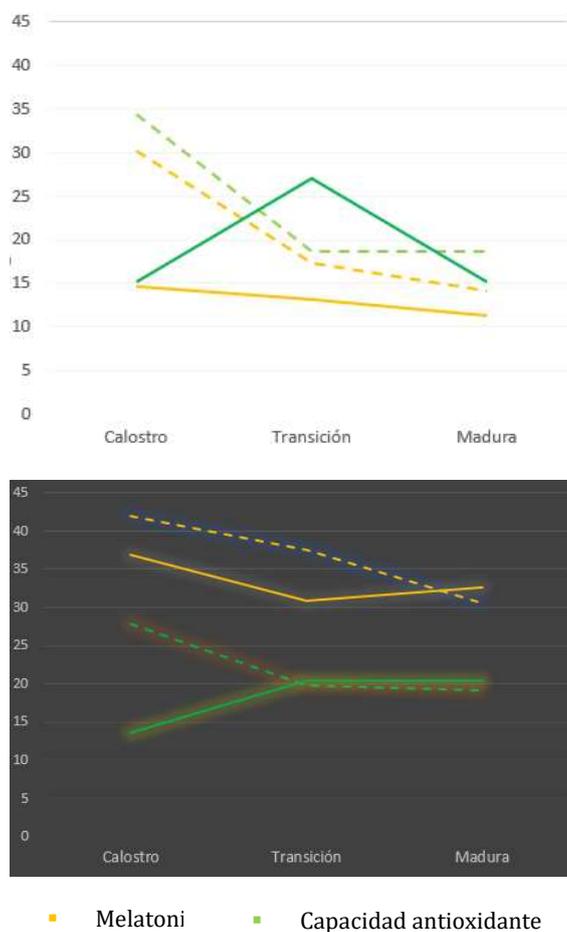


Figura 7. Las líneas discontinuas representan el grupo de parto por cesárea. Las líneas continuas representan el grupo de partos vaginales. Los valores diurnos se representan sobre fondo blanco. Los valores nocturnos se representan sobre fondo negro.

Figura 8. Representación conjunta de la evolución en el contenido en melatonina (pg/mL) y grupos carbonilo (expresado en nmol/mg x 100) en leche materna en función del tipo de parto a lo largo del primer mes de lactancia

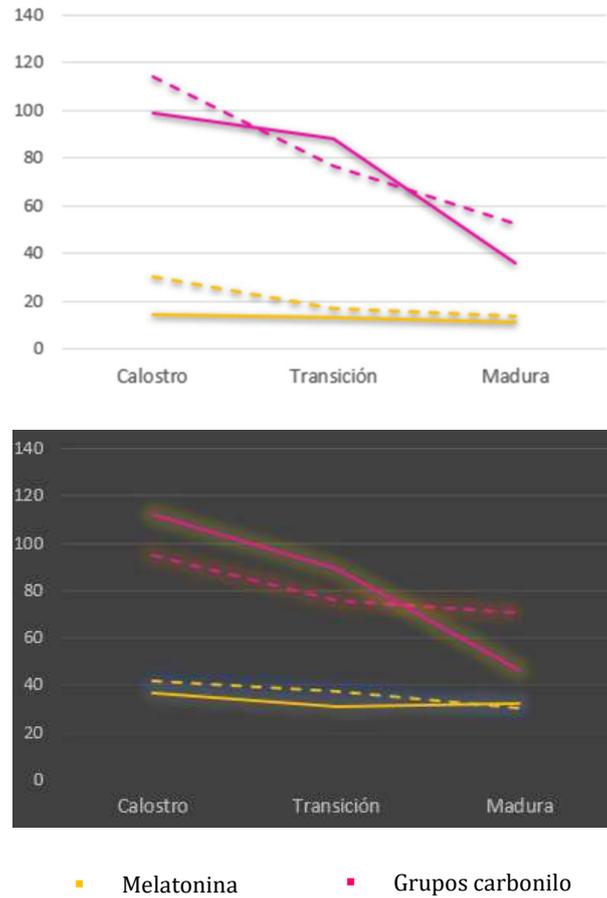


Figura 8. Las líneas discontinuas representan el grupo de parto por cesárea. Las líneas continuas representan el grupo de partos vaginales. Los valores diurnos se representan sobre fondo blanco. Los valores nocturnos se representan sobre fondo negro.

6.9.3. Cambios de todas las variables en la leche materna de la noche respecto al día

Se encontró mayor contenido en melatonina en la leche materna nocturna de todas las fases de la lactancia independientemente del tipo de parto ($p < 0.05$ en todas las muestras). No existen diferencias en esta forma de evolucionar a lo largo del día en función del tipo de parto (Tabla 8; Figura 9).

Tabla 8. Cambios en el contenido en IL6, TNF- α , grupos carbonilo, DPPH y melatonina en la leche materna en el día y la noche, y en cada momento de la lactancia. Diferencias en función del tipo de parto.

Variable	Día	Parto vaginal		Parto por cesárea		p2
		Mediana (Q1, Q3)	p1	Mediana (Q1, Q3)	p1	
IL6 (pg/ml)	1	0,01 (-0,70, 1,49)	0,644	0,01 (-9,9 , 0,01)	0,061	0,218
	3	0,01 (-6,48, 0,00)	0,025	0,01 (-8,15, 0,01)	0,165	0,595
	30	0,01 (-0,60, 4,18)	0,490	0,01 (-0,60, 0,01)	0,315	0,642
TNF- α (pg/ml)	1	0,01 (0,01, 1,92)	0,365	0,01 (-3,66, 0,01)	0,097	0,043
	3	0,01 (0,01, 1,67)	0,850	0,01 (-1,30, 0,29)	0,889	0,440
	30	0,01 (0,01, 2,12)	0,237	0,01 (-1,10, 0,67)	0,360	0,199
Carbonilos (nmol/ mg prot)	1	440 (-3300, 2200)	0,887	-1870 (-3135, -880)	0,107	0,256
	3	-330 (-1870, 660)	0,407	1650 (-770, 2860)	0,362	0,089
	30	0,01 (-1650, 2090)	0,166	1650 (-990, 2860)	0,582	0,391
DPPH (mmol/Trolox)	1	0,01 (-73,6, 70,0)	0,820	-19,4 (-106, 71,4)	0,362	0,553
	3	0,01 (-8,53, 111)	0,484	-18,7 (-139, 104)	0,952	0,113
	30	0,01 (-74,0, 90,6)	0,679	0,01 (-119, 94,1)	0,465	0,686
Melatonina (pg/ml)	1	10,9 (0,60, 26,9)	0,003	14,3 (-4,43, 29,2)	0,031	0,881
	3	16,0 (1,17, 32,7)	0,007	12,4 (-4,53, 37,1)	0,020	0,632
	30	13,6 (0,96, 26,2)	0,000	17,5 (12,6, 34,7)	0,000	0,099

Tabla 8. Las comparaciones se realizan con la prueba de rangos con signo de Wilcoxon. Se representan la mediana y cuartiles inferiores y superiores (percentiles 25 y 75).

p¹ corresponde a las comparaciones intragrupos (vaginal o cesárea). p² corresponde a las comparaciones intergrupo (vaginal versus cesárea).

1: calostro; 3: leche de transición; 30: leche madura.

Figura 9. Cambios en el contenido de melatonina en la leche materna en las diferentes fases de la lactancia, durante el día y la noche, en función del tipo de parto

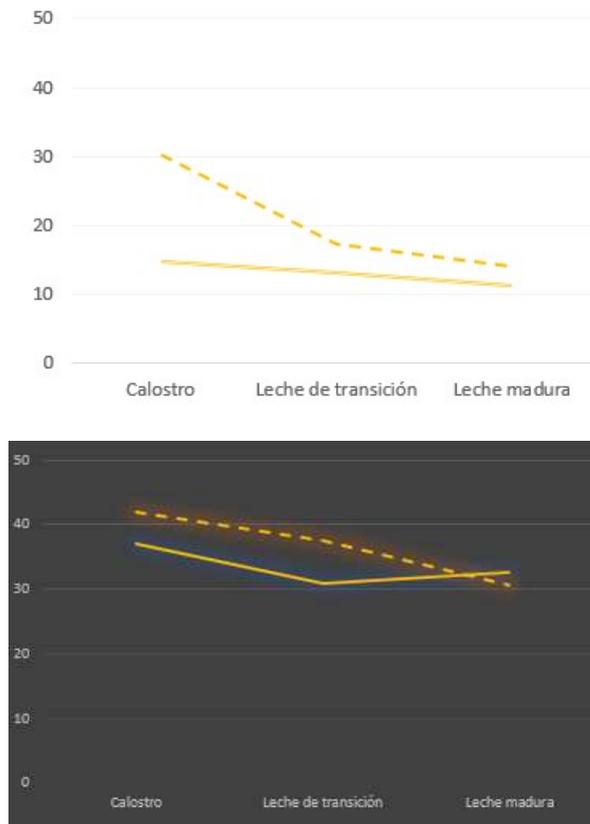


Figura 8. Evolución en el contenido en melatonina en leche materna en las diferentes fases de la lactancia estudiadas en el primer mes tras el parto. Las líneas discontinuas representan el grupo de parto por cesárea. Los valores diurnos se representan sobre fondo blanco. Los valores nocturnos se representan sobre fondo negro.

6.9.4. Correlaciones con los valores de melatonina.

6.9.4.1. Correlaciones entre melatonina y el resto de variables.

- En el grupo de parto vaginal, no se observan correlaciones importantes entre melatonina y los parámetros de estrés oxidativo en calostro ni en la leche de transición. Se observa correlación negativa moderada entre la melatonina y el contenido en grupos carbonilo en la leche materna madura diurna (tal cual aumenta el contenido en melatonina, disminuye el contenido en grupos carbonilo; $R = -0,53$).
- En el grupo de cesáreas, se observa correlación positiva entre melatonina y grupos carbonilo, así como entre melatonina y DPPH en el calostro diurno (a más contenido en melatonina, más contenido en grupos carbonilo y DPPH; $R = 0,50$ y $R = 0,70$ respectivamente). Además, cuando se trata del calostro nocturno en el grupo de cesáreas, la correlación entre el contenido en melatonina y los grupos carbonilo es negativa (tal cual aumenta el contenido en melatonina, disminuye el contenido en grupos carbonilo; $R = -0,66$). (Tablas 9; Tabla 10; Figura 10; Figura 11; Figura 12).

Tabla 9. Correlación del contenido de cada una de las variables inflamatorias (IL6, TNF- α e IFN γ) en leche materna respecto al de melatonina en función del tipo de parto, del momento del día y del momento de lactancia.

Variable	Momento	Día	Vaginal			Cesárea		
			n	Coef.	p	n	Coef.	p
IL6 (pg/ml)	Día	1	20	-0,42	0,065	17	0,32	0,207
		3	18	-0,36	0,139	18	-0,33	0,180
		30	17	0,03	0,900	13	0,47	0,108
	Noche	1	19	-0,14	0,571	16	-0,20	0,449
		3	17	-0,08	0,752	15	0,20	0,485
		30	15	-0,20	0,468	14	0,33	0,249
TNF- α (pg/ml)	Día	1	20	-0,32	0,163	17	0,31	0,222
		3	18	-0,44	0,067	18	-0,13	0,597
		30	17	0,12	0,652	13	0,48	0,096
	Noche	1	19	-0,23	0,334	16	-0,01	0,960
		3	17	0,03	0,909	15	0,11	0,695
		30	15	-0,52	0,049	14	0,23	0,422
IFN γ (pg/ml)	Día	1	20	-0,31	0,180	17	0,42	0,091
		3	18	-0,13	0,621	18	-0,37	0,129
		30	16	-0,03	0,909	13	0,46	0,116
	Noche	1	19	-0,32	0,176	16	-0,31	0,245
		3	17	0,16	0,549	15	0,08	0,769
		30	15	-0,02	0,950	14	0,19	0,526

Tabla 9. Comparación de los coeficientes de correlación de Spearman para las variables inflamatorias y el contenido en melatonina en la leche materna en función del tipo de parto. 1: calostro; 3: leche de transición; 30: leche madura

Tabla 10. Correlación del contenido en productos de estrés oxidativo (grupos carbonilo) en leche materna y del contenido antioxidante de la leche materna, respecto al de melatonina en función del tipo de parto, del momento del día y del momento de lactancia.

Variable	Momento	Día	Vaginal			Cesárea			
			n	Coef	p	n	Coef	p	
Carbonilos (nmol/mg proteína)	Día	1	10	0,36	0,313	3	0,50	1,000	
		3	14	0,13	0,669	7	-0,41	0,355	
		30	14	-0,53	0,052	10	0,14	0,700	
	Noche	1	7	-0,39	0,396	6	-0,66	0,175	
		3	16	0,36	0,170	6	-0,37	0,497	
		30	11	0,07	0,839	12	-0,35	0,272	
	DPPH (mmol/equival Trolox)	Día	1	19	-0,12	0,630	17	0,70	0,002
			3	15	0,18	0,510	18	0,42	0,081
			30	16	0,00	0,991	13	0,19	0,529
Noche		1	16	0,21	0,444	16	-0,12	0,655	
		3	15	-0,09	0,746	15	0,38	0,162	
		30	13	0,13	0,672	14	0,37	0,197	

Tabla 10. Comparación de los coeficientes de correlación de Spearman para las variables inflamatorias y el contenido en melatonina en la leche materna en función del tipo de parto. 1: calostro; 3: leche de transición; 30: leche madura

Figura 10. Gráficas de dispersión para las correlaciones del metabolismo oxidativo con el contenido de melatonina

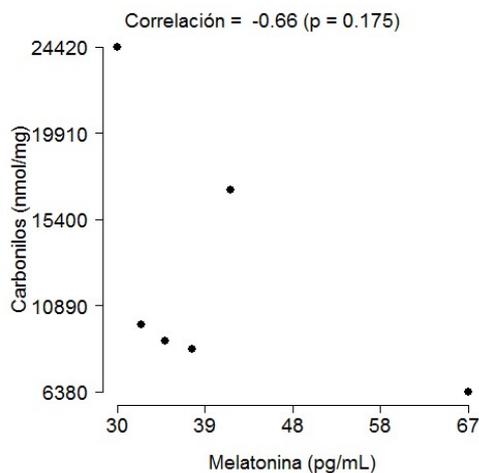


Figura 9. Gráfico de dispersión donde se representa la correlación entre los valores de melatonina (eje de las X) con los del contenido en grupos carbonilo (eje de las Y), en las muestras de calostro materno nocturno procedente de madres con antecedente de parto por cesárea. Coeficiente de correlación R = -0.66, n = 6

Figura 11. Gráfico de dispersión para las correlaciones entre melatonina y grupos carbonilo

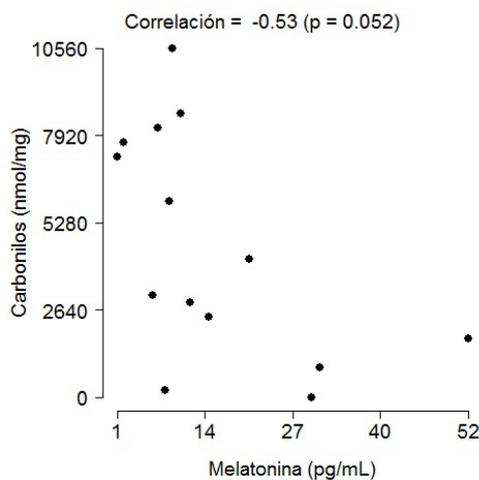


Figura 10. Gráfico de dispersión donde se representa la correlación entre los valores de melatonina (eje de las X) con los del contenido en grupos carbonilo (eje de las Y), en las muestras de leche materna madura diurna procedente de madres con antecedente de parto vaginal. Coeficiente de correlación R = -0.53; n = 14

6.9.4.2. Correlación entre la evolución en el contenido de melatonina y la evolución experimentada por el resto de variables.

- En lo que respecta a los partos por cesárea, por un lado, la evolución que experimentan los parámetros inflamatorios desde el primer día, presenta una correlación positiva con la evolución que muestra el contenido en melatonina durante la noche. Esto es así, tanto para el TNF- α como el IFN γ , al tercer y treinta día tras cesárea respecto al primer día (R = 0,66; R = 0,67; R = 0,63; R = 0,69, respectivamente). Es decir, a lo largo de la lactancia durante el primer mes tras la cesárea, el contenido en los parámetros inflamatorios de la leche materna nocturna disminuye paralelamente al descenso en el contenido en melatonina. (Tabla 11). Durante el día, se insinúa paralelismo en la forma de evolucionar de la melatonina y el contenido en grupos carbonilo, ya que la variación que experimentan al día 3 y 30 presenta correlación positiva, en el grupo de cesárea (R = 1 y R = 0,50, respectivamente), pero estos hallazgos representan una n pequeña en nuestro estudio. Podría existir una disminución paralela de los parámetros de estrés oxidativo en leche materna diurna detectados precozmente tras el parto por cesárea, junto al descenso en el contenido en melatonina en leche materna diurna a lo largo del primer mes, tras el parto por cesárea. Sin embargo, ocurre al contrario cuando se trata de las muestras nocturnas (R = -1 y R = -0,9, respectivamente). Es decir, por la noche tras el parto por cesárea, el descenso progresivo en el contenido en grupos carbonilo en la leche materna sería contrario al incremento en el contenido en melatonina nocturna. Además, se observa que en el grupo de cesáreas, existe una correlación positiva fuerte entre la evolución que experimenta en la leche

materna diurna el contenido en melatonina y la de la capacidad antioxidante (DPPH) al día 30 respecto al primer día, siendo la n estudiada más representativa ($R = 0,85$). (Tabla 12; Figura 13).

En conclusión, cuando se trata de partos por cesárea, se observa un descenso paralelo en el contenido en melatonina y el de productos de estrés oxidativo en la leche materna diurna a lo largo de la lactancia durante el primer mes. Durante la noche, a lo largo de la lactancia materna tras el parto por cesárea, un descenso en el contenido de melatonina aumentaría el de grupos carbonilo carbonilo. Además, el descenso en el contenido de melatonina en la leche madura diurna tras el parto por cesárea, supone también un descenso en la capacidad antioxidante total a lo largo del primer mes tras el parto por cesárea.

- En el caso de partos vaginales, al igual que en el caso de partos por cesárea, existe una fuerte correlación negativa entre la variación en el contenido de melatonina y el de grupos carbonilo en la leche madura nocturna respecto al del calostro ($R = -0,80$). Es decir, el descenso en el contenido en melatonina de la leche materna nocturna a lo largo del primer mes tras el parto vaginal, provocaría un aumento en el contenido en grupos carbonilo.

Tabla 11. Correlación de la forma en que evolucionan las variables inflamatorias (IL6, TNF- α e IFN γ) en leche materna respecto a la de la melatonina al tercer y treinta día tras el parto desde el primer día, en función del tipo de parto, del momento del día y del momento de lactancia.

Variable	Momento	Día	Vaginal			Cesárea		
			n	Coef.	p	n	Coef.	P
IL6 (pg/ml)	Día	3	17	-0,32	0,211	16	0,43	0,096
		30	14	-0,17	0,565	11	0,17	0,620
	Noche	3	14	0,01	0,976	12	0,43	0,158
		30	10	0,50	0,141	10	0,55	0,102
TNF (pg/ml)	Día	3	17	-0,22	0,406	16	0,42	0,106
		30	14	-0,44	0,117	11	0,05	0,884
	Noche	3	14	-0,04	0,904	12	0,66	0,020
		30	10	-0,26	0,464	10	0,67	0,035
IFN γ (pg/ml)	Día	3	17	-0,38	0,136	16	0,45	0,080
		30	13	-0,12	0,704	11	0,22	0,515
	Noche	3	14	0,05	0,874	12	0,63	0,027
		30	10	0,06	0,879	10	0,69	0,026

Tabla 11. Comparación de los coeficientes de correlación de Spearman para la evolución que experimentan las variables inflamatorias y el contenido en melatonina en la leche materna en función del tipo de parto a largo del primer mes de lactancia. 3: evolución desde el calostro a la leche de transición; 30: evolución desde el calostro a la leche madura.

Tabla 12. Correlación de la forma en que evolucionan los productos de estrés oxidativo (grupos carbonilo), y la capacidad antioxidante de la leche materna, respecto a la de la melatonina al tercer y treinta día tras el parto desde el primer día, en función del tipo de parto, del momento del día y del momento de lactancia.

Variable	Momento	Día	Vaginal			Cesárea		
			n	Coef.	p	n	Coef.	p
Carbonilos	Día	3	7	0,21	0,662	2	1,00	1,000
		30	5	0,36	0,553	3	0,50	1,000
	Noche	3	5	-0,10	0,950	3	-1,00	0,333
		30	4	-0,80	0,333	5	-0,90	0,083
DPPH	Día	3	15	-0,39	0,149	16	0,41	0,114
		30	13	-0,52	0,070	11	0,85	0,002
	Noche	3	12	-0,15	0,640	12	0,03	0,921
		30	8	-0,16	0,713	10	-0,04	0,919

Tabla 12. Comparación de los coeficientes de correlación de Spearman para la evolución que experimenta el metabolismo oxidativo y el contenido en melatonina en la leche materna en función del tipo de parto a largo del primer mes de lactancia. 3: evolución desde el calostro a la leche de transición; 30: evolución desde el calostro a la leche madura.

Figura 13. Gráficas de dispersión para la correlación entre la evolución que experimenta la capacidad antioxidante y el contenido en melatonina en leche materna a lo largo del primer mes de lactancia

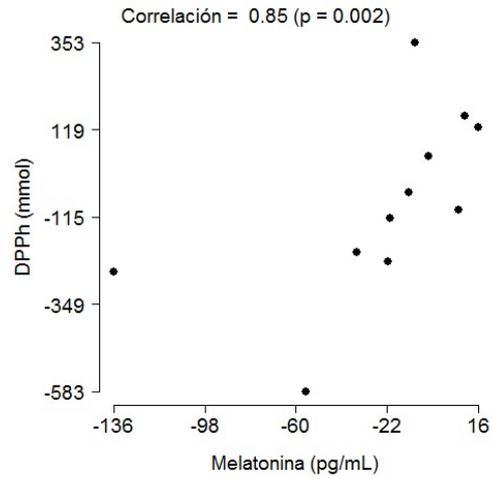


Figura 12. Gráfico de dispersión donde se representa la correlación entre la evolución que experimenta la melatonina (eje de las X) con la de la capacidad antioxidante, DPPH (eje de las Y), en las muestras de leche materna madura diurna procedente de madres con antecedente de parto por cesárea. Coeficiente de correlación $R = 0.85$; $n = 11$

COMENTARIOS DE LOS RESULTADOS

7. COMENTARIOS DE LOS RESULTADOS

PARÁMETROS INFLAMATORIOS EN LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO

Está demostrado a nivel bioquímico, que en el parto normal están implicados una compleja red de fenómenos inflamatorios y de estrés oxidativo (100,158–160). Existe heterogeneidad en lo referente a las diferencias en cuanto a daño inflamatorio en función del tipo de parto. Además, las investigaciones al respecto se basan fundamentalmente en muestras de plasma, líquido amniótico o biopsias de tejidos amnióticos y/o fetales.

En nuestro estudio, se encontró mayor contenido en algunos parámetros inflamatorios en la leche materna correspondiente a los primeros días tras el parto por cesárea (mayor contenido en IL6 y TNF α en calostro y leche de transición diurnos). Estas diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Estos hallazgos van en consonancia con algunos estudios, que demuestran una mayor repercusión tras el parto por cesárea en cuanto a los parámetros inflamatorios se refiere, al demostrar mayor contenido en citoquinas en sangre materna o neonatal, o en membranas placentarias o amnióticas. Bessler et al, tras comparar interleucinas en plasma de madres y recién nacidos vía parto vaginal versus cesárea, encontraron mayores niveles de TNF α en los recién nacidos con antecedente del parto por cesárea, medido al segundo día de vida (161). En el mismo sentido, Hu et al observaron mayor expresión de algunas interleucinas, como la IL-6 , IL-8 o IFN γ en las placentas de madres tras parto por cesárea no urgente, al compararlas con placentas procedentes de madres sanas tras parto vaginal, tratándose de una cohorte grande de casi 2000 mujeres sanas con partos a término y una prevalencia de cesárea del 50% (162).

Nuestro estudio añade valor a estos hallazgos, demostrándose también este incremento en los parámetros inflamatorios en la leche materna tras el parto por cesárea. Además, se observa una progresión descendiente en el contenido de algunos marcadores inflamatorios (IL 6 y TNF α) a lo largo de la lactancia cuando se trata de partos por

cesárea: es decir, existe menos contenido inflamatorio en la leche madura tras cesárea, respecto al encontrado en el calostro tras el parto por cesárea. Esta tendencia longitudinal se observa tanto en la leche materna diurna como en la nocturna. Este descenso progresivo en los parámetros inflamatorios tras el parto por cesárea a lo largo del primer mes sugiere una mejoría paulatina en el daño inflamatorio ocurrido tras dicho procedimiento quirúrgico.

Estas variaciones en los parámetros inflamatorios no se observan en ninguna de las fases de la lactancia cuando se trata de partos vaginales.

METABOLISMO OXIDATIVO EN LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO

Desde el trabajo de Yaacobi et al, en 1999, donde se demostró que el trabajo de parto desencadena fenómenos de estrés oxidativo, objetivables tanto en sangre materna como neonatal (133), son numerosos los estudios en la búsqueda de cambios o consecuencias secundarias al estrés oxidativo perinatal bajo circunstancias especiales como la prematuridad o la práctica de una cesárea (104,105,160,163,164). En lo que respecta a las diferencias a nivel de estrés oxidativo dependiendo del tipo de parto, existe heterogeneidad de variables y hallazgos en diferentes estudios. Las variables y circunstancias estudiadas hasta la fecha presentan muchas diferencias entre sí, pero prácticamente en su mayoría, las investigaciones están realizadas sobre plasma o sangre materna y de recién nacido.

En nuestro estudio, buscando diferencias exclusivamente en leche materna, se observa mayor contenido en productos de estrés oxidativo, como los grupos carbonilo, aunque no de forma estadísticamente significativa, en las muestras de calostro diurno tras los partos por cesárea respecto al procedente de madres que parieron vía vaginal. Dichos resultados apoyan la hipótesis de mayor estrés oxidativo tras la práctica de una cesárea. Nabhan et al encontraron también datos a favor de mayor repercusión en daño oxidativo al determinar productos de peroxidación lipídica, en concreto, malonilaldheido, en sangre venosa umbilical tras el parto por cesárea al compararlos con partos vaginales no complicados (165). En el mismo sentido, Mutlu et al encuentran mayor estrés oxidativo tanto en sangre materna como neonatal tras la práctica de una cesárea (128). Otras investigaciones, o bien no encontraron diferencias significativas dependiendo del tipo de parto (131,132), o bien encontraron mayor estrés oxidativo en plasma de recién nacido tras parto vaginal al compararlo con el de parto por cesárea electiva, como en el estudio de Vakilian et al (166).

Coincidente con nuestros resultados, Simsek et al encontraron mayor estrés oxidativo en leche materna del segundo día tras el parto por cesárea, al compararla con la leche materna tras parto vaginal (167).

Aunque nuestras diferencias no son significativas, y a pesar de encontrar menos contenido en grupos carbonilo en la leche materna inmediatamente tras el parto vaginal, sí lo es el descenso que experimenta el contenido en grupos carbonilo en la leche madura al mes tras el parto vaginal con respecto al que había en el calostro de ese mismo grupo. Al buscar diferencias entre grupos, no se encontraron diferencias en cómo evolucionan estos parámetros de estrés oxidativo a lo largo del primer mes, entre ambos grupos: existe un descenso progresivo, independientemente del tipo de parto, pero este descenso es más evidente cuando se trata del grupo de partos vaginales. Es decir, el daño oxidativo va desapareciendo progresivamente durante el primer mes, sin embargo, el contenido en grupos carbonilo es mayor en la leche materna madura nocturna si el parto ha sido por cesárea.

Tal cual se sugiere en otras investigaciones, el parto, tanto si es vaginal como si es por cesárea, desencadena fenómenos de estrés oxidativo detectables tanto en plasma de madres y/o sus recién nacidos (102,104) . Nuestro estudio sugiere, que la leche materna refleja, al igual que el plasma, signos bioquímicos de estrés oxidativo que persisten incluso al mes del parto en el caso de parto por cesárea. Watanabe K. et al encontraron mayor estrés oxidativo en sangre materna tras la práctica de una cesárea al compararla con partos vaginales a término, pero menor estrés oxidativo en sangre de recién nacidos (arteria umbilical) tras el parto por cesárea (129). Es decir, el estrés oxidativo es mayor en las madres a las que se les practicó una cesárea, pero menor en los recién nacidos por cesárea. Nuestros resultados en este sentido, apoyan los resultados de Watanabe al demostrar, además, mayor estrés oxidativo en le leche materna de madres con el antecedente de parto por cesárea.

MELATONINA EN LECHE MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO

Nuestro estudio demuestra que existe ritmicidad en contenido de melatonina en la leche materna en condiciones de normalidad a lo largo del día, independientemente del tipo de parto, del mismo modo que ocurre fisiológicamente en plasma. Este ritmo circadiano de la melatonina en la leche materna se observa en las tres fases de la lactancia materna: calostro, leche de transición y leche madura.

Existe sólo un estudio que describe el ritmo circadiano de la melatonina en la leche materna, pero se trata de un estudio realizado sólo en 10 madres, y donde no se tienen en cuenta factores como el tipo de parto u otras condiciones maternas (168). En nuestra investigación se seleccionó previamente a las madres, con el objetivo de incluir sólo aquellas que presentaran unas condiciones de normalidad o ausencia de enfermedades crónicas con daño oxidativo previo o durante la gestación. El tamaño de la muestra estudiada es mayor que lo publicado hasta el momento. De esta forma, la muestra seleccionada es más representativa y extrapolable a la población general en nuestro medio.

En nuestro estudio, el principal resultado es que el contenido en melatonina en las muestras de calostro diurno en las primeras 24 horas tras el parto por cesárea es mayor al comparar con el grupo de partos vaginales. Estos hallazgos son similares a los de otros estudios, donde los niveles de melatonina en el calostro materno tras cesárea electiva son mayores respecto a los de cesárea urgente (169). Sin embargo, contrario a nuestros resultados, en el estudio de Nami Kalem et al., los niveles de melatonina tras parto vaginal son mayores que los de parto por cesárea. En este estudio los partos prematuros sí están incluidos, así como los recién nacidos asfícticos. Sin embargo, los pacientes con estas características fueron excluidos en nuestra investigación, lo cual influye en los resultados finales. De hecho, algunos estudios recientes, como el de Qin et al (170), encontraron más contenido en melatonina en la leche materna nocturna de madres con partos prematuros, respecto al de madres con antecedente de parto a término, siendo significativamente

mayor el pico de melatonina en el calostro del grupo de prematuros respecto al del grupo de niños a término ($2,4 \pm 1.04$).

En nuestro estudio, a pesar de encontrar mayor contenido en melatonina durante el día en las muestras de calostro tras cesárea, el contenido nocturno de melatonina en dicho grupo es también significativamente mayor que el diurno, por lo tanto, sigue existiendo ritmicidad a lo largo del día. Estas fluctuaciones rítmicas demostradas en el contenido de melatonina en la leche materna son esenciales desde el punto de vista de la cronobiología, e imprescindibles para marcar los ciclos día/noche de los recién nacidos, dado que la síntesis propia de melatonina no se inicia hasta el sexto mes de vida aproximadamente. Este hecho refuerza la importancia de la lactancia materna para el desarrollo neurológico infantil y revela que la leche humana es una fuente poderosa de información en cuanto a crononutrición para el recién nacido. Las variaciones cronobiológicas de la leche humana pueden, incluso en la leche humana extraída, representar un mecanismo adicional que mejora la adaptación del recién nacido amamantado a las condiciones ambientales. Dado que la leche materna extraída es la opción que se ha demostrado más segura para la alimentación de neonatos que no pueden amamantar directamente, especialmente los neonatos de alto riesgo, como los grandes prematuros, sería deseable coordinar los horarios de administración de la leche humana extraída en función del momento del día en el que tuvo lugar la extracción (154,171). De hecho, otros componentes tanto a nivel hormonal, como a nivel de micro o macronutrientes provocan estímulos circadianos que contribuyen al bienestar del recién nacido (153). Lima et al demostraron mayor degradación, y por lo tanto, menos contenido en vitamina B1 y B2 en muestras de leche materna extraída expuesta a la luz (152). Existe una revisión reciente donde se encuentra suficiente evidencia en la literatura científica que demuestra que la composición de la leche materna es dinámica a lo largo del día, especialmente en algunos de sus componentes bioactivos, como el triptófano, la

melatonina, el cortisol, así como algunas vitaminas y hierro, presentando variaciones entre el día y la noche(172).

Las condiciones lumínicas en las que se recoge, se almacena y se procesa la leche materna son fundamentales para conservar los ritmos circadianos de muchos de sus componentes. Si las condiciones lumínicas en la metodología de tratamiento de la leche materna no respetan la oscuridad, los resultados obtenidos podrían verse alterados (154,173). Esto podría justificar en gran parte la dificultad y heterogeneidad en lo publicado hasta la fecha. En nuestra investigación, las condiciones de poca luz se respetaron durante todo el proceso de recogida, almacenamiento y procesamiento de las muestras, mediante el uso de envoltorio opaco, la utilización de focos de luz tenue alejados de las madres, y el mantenimiento en congelador cerrado en oscuridad en todo momento.

Dado el diseño longitudinal del estudio, con el objetivo de investigar la tendencia que experimenta el contenido de melatonina en la leche materna a lo largo de las diferentes fases de la lactancia, se observa que el comportamiento rítmico encontrado en la leche materna, al igual que ocurre en sangre, es invariable en las distintas fases de la lactancia estudiadas (calostro, leche de transición y leche madura) e independiente al tipo de parto. Estos hallazgos son similares a los encontrados por Qin et al, donde el pico de melatonina fue mayor en las muestras de calostro nocturno en el grupo de prematuros, y la ritmicidad en el contenido de melatonina en la leche materna se mantuvo en las diferentes fases de la lactancia, tanto en el grupo de prematuros, como en el caso de partos a término (170).

El incremento en el contenido en melatonina en la leche materna nocturna corresponde a lo esperable según la fisiología de la secreción humana de melatonina, lo cual demuestra la validez y fiabilidad de la técnica usada para la determinación de la melatonina en la leche materna.

Por otro lado, tal cual progresa la lactancia, a lo largo de las diferentes fases estudiadas, el contenido en melatonina disminuye progresivamente, tanto durante el día

como por la noche, en ambos grupos: vaginal y cesárea; pero el descenso es más marcado en la leche de transición respecto al calostro, tras el parto por cesárea. El contenido en melatonina en la leche madura, al mes de vida, no muestra diferencias en función del tipo de parto, lo cual apoya la hipótesis de que la melatonina ejerce un papel protector para el recién nacido frente al daño inflamatorio y oxidativo los primeros días de vida.

La hipótesis de que el daño inflamatorio y oxidativo es mayor si se practicó una cesárea, se ve apoyada por los cambios observados en el contenido en melatonina en la leche materna procedente de madres tras el antecedente de cesárea durante el primer mes, ya que, cuando se trata de partos vaginales, el contenido en melatonina en leche materna no experimenta las variaciones observadas en el grupo de cesáreas, y permanece más estable de forma global.

***ASOCIACIÓN ENTRE MELATONINA, INFLAMACIÓN Y ESTRÉS OXIDATIVO EN LECHE
MATERNA EN FUNCIÓN DEL TIPO DE PARTO***

Nuestros resultados apoyan la hipótesis formulada de que la melatonina en leche materna podría ejercer un papel antioxidante protector en el recién nacido.

En las primeras horas tras la práctica de una cirugía mayor, como es el caso del parto por cesárea, donde existe más estrés oxidativo e inflamatorio en las madres, tal cual se refleja en los parámetros de inflamación y estrés oxidativo en el calostro materno, se observa también mayor contenido en melatonina, paralelamente al mayor contenido en la capacidad antioxidante total en comparación con los partos vaginales. Además, la asociación entre la melatonina y los parámetros de estrés oxidativo, así como con la capacidad antioxidante total, es positiva en el calostro diurno tras la práctica de una cesárea, mientras esta asociación se negativiza en las muestras nocturnas, de modo que, a mayor contenido de melatonina en el calostro diurno, mayor es el contenido en grupos carbonilo, pero también la capacidad antioxidante total. En las muestras nocturnas del mismo grupo, a mayor aumento en el contenido en melatonina, menor es el contenido en grupos carbonilo.

Existen algunos estudios donde se han descrito alteraciones en la secreción de melatonina tras factores estresantes inflamatorios, como en el caso de parto por cesárea, encontrando los autores ausencia en el pico nocturno de melatonina en leche materna al tercer día post-cesárea en un grupo de 9 madres. Pontes et al compararon el nivel de melatonina en la leche materna de mujeres con parto vaginal versus cesárea al tercer día de vida del bebé(63). En este estudio hubo un aumento nocturno en los niveles de melatonina en la leche materna después del parto vaginal pero no después de una cesárea. Por otro lado, no se detectaron diferencias significativas entre la secreción diurna y nocturna de melatonina en el calostro de las madres del grupo de cesáreas al tercer día de vida. Los autores sugieren que un mayor nivel de TNF α en el caso de una cesárea podría bloquear la producción de melatonina a nivel pineal. Los resultados observados en nuestra

investigación pueden deberse, por un lado, a diferencias en los procedimientos quirúrgicos. Cabe señalar que las indicaciones y condiciones de las cesáreas en las pasadas décadas eran muy diferentes a las de hoy en día. Debido a la mejora en los procedimientos de anestesia, la cesárea electiva es menos estresante y podría estar asociada con una inflamación menos intensa (174). En nuestra investigación, se realizó anestesia epidural en todas las madres incluidas independientemente del modo de parto. Además, se excluyeron cesáreas de emergencia o madres bajo anestesia general. Por lo tanto, las características de la población estudiada son más homogéneas y se esperan unos efectos inflamatorios u oxidativos menos adversos. De hecho, en el estudio de Pontes et al. no existe variación en el contenido de melatonina diurno respecto al nocturno tras la práctica de cesárea, lo cual está en consonancia con nuestros hallazgos (mayor contenido de melatonina diurna en el calostro tras la práctica de una cesárea, similar al contenido nocturno). Esta ausencia en el descenso fisiológico diurno de melatonina tras un evento inflamatorio importante, como una cesárea, podría ser reflejo de un efecto protector frente al daño oxidativo. Además, por otro lado, en nuestra investigación se recogió calostro dentro de las primeras 24 horas tras el parto o cesárea, a diferencia del método de recogida en el estudio de Pontes, que se realizó más tarde, al tercer día tras el parto, momento donde los mecanismos estresantes que podrían estar presentes tempranamente tras el parto, podrían empezar a mejorar, lo cual influiría en los resultados obtenidos.

Hay diversos estudios con el objetivo de determinar diferencias en cuanto a estrés oxidativo se refiere, dependiendo del tipo de parto, con resultados muy heterogéneos (117,123,125,126,128,166,175,176). Algunas investigaciones encuentran mayor estrés oxidativo, bien mediante la determinación de productos de estrés oxidativo (176), o bien mediante la medición en el contenido enzimático antioxidante (126) en cordón umbilical. Además, algunos estudios encuentran mayor contenido en los parámetros de estrés oxidativo tanto en sangre materna como en sangre del recién nacido, tras la práctica de una cesárea (128). Una revisión reciente concluye no encontrar diferencias

estadísticamente significativas en los parámetros de estrés oxidativo a nivel neonatal en función del tipo de parto (135). Toda la investigación está realizada fundamentalmente en muestras de sangre o plasma. Existe una falta de estudios o análisis de la leche materna en este sentido.

Nuestro estudio se basa en el estudio de los parámetros de estrés oxidativo e inflamación exclusivamente en leche materna. Se observa de forma global mayor contenido en los parámetros inflamatorios y productos de estrés oxidativo (grupos carbonilo) en la leche materna procedente de madres con antecedente de parto por cesárea, y de forma significativa, mayor capacidad antioxidante, así como mayor contenido en melatonina en el calostro diurno tras el parto por cesárea. Este mayor contenido en melatonina y capacidad antioxidante del calostro diurno en las primeras 24 horas tras el parto por cesárea apoya la hipótesis formulada sobre el papel antioxidante y protector de la melatonina en la leche materna. Además, tal cual avanza la lactancia a lo largo del primer mes, con la esperable disminución progresiva de los parámetros inflamatorios, se observa una tendencia en el descenso paralelo de la melatonina, la capacidad antioxidante total y los productos de estrés oxidativo en la leche materna diurna, lo que estaría reflejando la resolución progresiva del fenómeno estresante de la cesárea.

Qin et al. también encontraron más pico de melatonina en el calostro nocturno independientemente de la edad gestacional (170). Además, en este estudio, las concentraciones de melatonina difirieron significativamente en función de la fase de la lactancia, siendo la concentración más alta detectada la del calostro, seguida de la leche materna de transición y madura en ambos grupos (a término y en prematuros). El tipo de parto no fue considerado en el estudio de Qin et al. Sin embargo, la leche de las mujeres después del parto prematuro mostró un mayor contenido de melatonina, al igual que lo publicado por Biran et al, siendo esperable mayor tasa de cesáreas en caso de parto prematuro (177). Estos hallazgos pueden estar en consonancia con nuestros resultados, donde, por un lado, el contenido de melatonina en el calostro es mayor respecto a otros

momentos de la lactancia, de forma general. Por otro lado, el contenido en melatonina del calostro fue mayor después de un contexto inflamatorio importante, como la cesárea en nuestro caso, o el parto prematuro en los estudios mencionados. De hecho, la evolución que experimenta la capacidad antioxidante total de la leche de transición, respecto a la del calostro, es significativamente diferente dependiendo del tipo de parto: en el caso de parto por cesárea, la capacidad antioxidante total de leche de transición diurna disminuye respecto a la del calostro, y es menor a la procedente de madres tras parto vaginal, donde aumenta respecto a la del calostro. Del mismo modo, el contenido en melatonina desciende significativamente en la leche de transición respecto a la del calostro tras el parto por cesárea.

Es decir, podría afirmarse que existe un aumento en la producción de melatonina precozmente tras la práctica de una cesárea electiva, consecuencia del daño inflamatorio y oxidativo, detectable en la leche materna diurna en las primeras 24 horas tras la cesárea (calostro). Tal cual avanza la lactancia tras la práctica de una cesárea, el aumento en el contenido de melatonina se asocia a un descenso en el contenido en grupos carbonilo, como puede observarse en la leche materna madura durante la noche.

Además, a lo largo del primer mes, existiría un consumo en la capacidad antioxidante de la leche materna: tras el aumento en los primeros días tras el parto por cesárea para contrarrestar el daño oxidativo e inflamatorio producido, se observa un descenso en la capacidad antioxidante total, de modo que la leche de transición tras el parto por cesárea presenta menor capacidad antioxidante total al compararla con la de madres que parieron vía vaginal en esa fase de la lactancia.

Papel de la melatonina en la capacidad antioxidante del calostro y leche humana madura.

Diferencias entre parto vaginal y parto por cesárea.

CONCLUSIONES

8.CONCLUSIONES

Nuestro estudio contribuye a ampliar los conocimientos del papel fundamental de la lactancia materna en el recién nacido, además desde el punto de vista de la cronobiología.

Los resultados obtenidos aportan información desde la que basar futuras investigaciones, ya que, con una intención descriptiva, la muestra utilizada es mayor que lo publicado hasta el momento, e incluye a madres sanas, sin patologías crónicas, y con partos a término. Al excluir madres con riesgo de patología obstétrica relacionada con el estrés oxidativo, se minimiza el principal inconveniente encontrado para la comparación de resultados de los estudios publicados hasta la fecha, debido a la heterogeneidad existente en el tipo de población incluida en los diferentes estudios. De esta forma, la muestra seleccionada es más representativa y extrapolable a la población general en nuestro medio.

Nuestros principales hallazgos son:

- I. El contenido en melatonina diurna en leche materna tras la práctica de una cesárea es significativamente mayor en las primeras 24 horas, al compararla con la de la leche materna tras un parto vaginal.
- II. Existe ritmicidad en el contenido de melatonina en leche materna a lo largo del día, en condiciones de ausencia de patología e independiente al tipo de parto.
- III. El método utilizado para la determinación del contenido en melatonina en la leche materna en cualquiera de las tres fases estudiadas, tanto en su forma de recogida y almacenamiento, como su procesamiento y determinación a nivel bioquímico demuestra validez y fiabilidad, debido al paralelismo en el ritmo circadiano objetivado con el descrito en el plasma.
- IV. En los primeros días tras el parto, la capacidad antioxidante de la leche materna de transición diurna tras el parto por cesárea es significativamente menor que la procedente de mujeres tras parto vaginal, en ese mismo momento de la lactancia.
- V. La forma en la que evoluciona la capacidad antioxidante de la leche materna en los primeros días es significativamente diferente dependiendo del tipo de parto: se observa un descenso de la misma al tercer día tras el parto por cesárea; mientras que un aumento significativo si se trata de parto vaginal, lo que podría corresponder a un mayor consumo antioxidante los primeros días tras la cesárea.
- VI. La leche materna procedente de madres tras un parto por cesárea presenta mayor contenido tanto en parámetros inflamatorios como en parámetros de estrés oxidativo de forma precoz en las muestras de calostro diurno en las primeras 24 horas tras la cesárea, lo cual podría ser reflejo del daño secundario al procedimiento quirúrgico.
- VII. Los parámetros de estrés oxidativo en la leche materna disminuyen a lo largo del primer mes, sin diferencias en esta forma de evolucionar entre ambos grupos, pero

este descenso resulta significativo en las muestras de leche madura diurna respecto al del calostro, en el grupo de partos vaginales.

- VIII. A pesar de que el daño oxidativo va desapareciendo durante el primer mes, éste permanece significativamente más alto en la leche materna madura nocturna si el parto fue por cesárea.
- IX. Globalmente, existe un descenso en melatonina a lo largo del primer mes de lactancia. Este descenso en melatonina va en paralelo al descenso en los parámetros de estrés oxidativo e inflamación, tras el antecedente de parto por cesárea.
- X. Respecto a las asociaciones encontradas, se observa asociación moderada entre el contenido en melatonina y el de estrés oxidativo en el calostro diurno tras el parto por cesárea, mientras que esta asociación se invierte en el calostro nocturno, lo que podría corresponder a un papel de “limpieza” antioxidante por parte de la melatonina del calostro diurno en este grupo.
- XI. Además, esta hipótesis cobra fuerza al encontrar una asociación fuerte entre el contenido en melatonina y la capacidad antioxidante del calostro materno diurno tras el parto por cesárea, asociación paralela o positiva que se observa también en la forma en la que evolucionan la melatonina y la capacidad antioxidante de la leche materna desde el primer al día treinta tras el parto por cesárea.

BIBLIOGRAFÍA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Holland HD. The Oxygenation of the aAtmosphere and Oceans. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2006;361(1470):903–15.
2. Taverne YJ, Merkus D, Bogers AJ, Halliwell B, Duncker DJ, Lyons TW. Reactive Oxygen Species: Radical Factors in the Evolution of Animal Life. *BioEssays.* 2018;1700158:1700158.
3. Cavalier-Smith T, Brasier M, Embley TM. Introduction: how and when did microbes change the world? *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2006;361(1470):845–50.
4. Jaworski K. The BreaTh of Life and deaTh. 2002;419(October):2002.
5. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *AJP Cell Physiol.* 2008;295(4):C849–68.
6. Chua S, Yeong SM, Razvi K, Arulkumaran S. Fetal oxygen saturation during labour. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 1997;104(9):1080–3.
7. Saugstad OD, Oei JL, Lakshminrusimha S, Vento M. Oxygen therapy of the newborn from molecular understanding to clinical practice. *Pediatr Res.* 2019;85(1):20–9.
8. Halliwell B. Reactive Species and Antioxidants. Redox Biology Is a Fundamental Theme of Aerobic Life. *Plant Physiol.* 2006;141(2):312–22.
9. Finkel T, Holbrook NJ. Biology of Ageing. 2000;408(November):239–47.
10. Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014;224:164–75.
11. Cadenas E, Davies KJ a. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging¹¹This article is dedicated to the memory of our dear friend, colleague, and mentor Lars Ernster (1920–1998), in gratitude for all he gave to us. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(3–4):222–30.
12. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12(5):913–22.

13. Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010;15(4):186–90.
14. Auten RL, Davis JM. Oxygen toxicity and reactive oxygen species: The devil is in the details. *Pediatr Res.* 2009;66(2):121–7.
15. Halliwell B. Tell me about free radicals, doctor: a review. *J R Soc Med.* 1989;82(12):747–52.
16. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48(6):749–62.
17. Pastor N, Weinstein H, Jamison E, Brenowitz M. A detailed interpretation of OH radical footprints in a TBP-DNA complex reveals the role of dynamics in mechanism of sequence-specific binding. *J Mol Biol.* 2000;304(1):55–68.
18. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 Jan 1;39(1):44–84.
19. Haber F WJ. The catalytic compensation of hydrogen peroxide by iron salts. *Proc R Soc London.* 1934;147:332–51.
20. Koppenol WH. The centennial of the Fenton reaction. *Free Radic Biol Med.* 1993 Dec 1;15(6):645–51.
21. Halliwell, B. & Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine.* 2nd ed. Clarendon Press, editor. Oxford; 1989.
22. López-Alarcón C, Denicola A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. *Anal Chim Acta.* 2013;763:1–10.
23. Sies H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997;82(2):291–5.
24. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem.* 1993;215:213–9.
25. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55–74.

26. Kodydková J, Vávrová L, Kocík M, Žák A. Human catalase, its polymorphisms, regulation and changes of Its activity in different diseases. *Folia Biol (Czech Republic)*. 2014;60(4):153–67.
27. Richard CR, Bode MA. *Biology radical*. 2017;7(12):1135–42.
28. Kamal-Eldin A, Appelqvist LÅ. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*. 1996;31(7):671–701.
29. Krinsky NI. The antioxidant and biological properties of the carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854:443–7.
30. Martin H-D, Jäger C, Ruck C, Schmidt M, Walsh R, Paust J. Anti- and Prooxidant Properties of Carotenoids. *J für Prakt Chemie*. 1999;341(3):302–8.
31. Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*. 2001;385(1):20–7.
32. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med*. 1996;20(7):933–56.
33. Cook NC, Samman S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *J Nutr Biochem*. 1996;7(2):66–76.
34. Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem*. 2002;13(10):572–84.
35. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(9–10):916–21.
36. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1–2):1–12.
37. El Ridi R, Tallima H. Physiological functions and pathogenic potential of uric acid: A review. *J Adv Res*. 2017;8(5):487–93.
38. Glantzounis G, Tsimoyiannis E, Kappas A, Galaris D. Uric Acid and Oxidative Stress. *Curr Pharm Des*. 2005;11(32):4145–51.

39. Reiter R, Tan D, SanchezBarcelo E, Mediavilla M, Gitto E, Korkmaz A. Circadian mechanisms in the regulation of melatonin synthesis: disruption with light at night and the pathophysiological consequences. *J Exp Integr Med.* 2011;1(1):13.
40. Arendt J. Melatonin and the pineal gland: influence on mammalian seasonal and circadian physiology. *Rev Reprod.* 1998 Jan;3(1):13–22.
41. Pandi-Perumal SR, Srinivasan V, Maestroni GJM, Cardinali DP, Poeggeler B, Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS J.* 2006 Jul;273(13):2813–38.
42. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Herrera F, Antoli, Isaac, Marin V, Reiter RJ. Regulation of antioxidant enzymes : a significant role for melatonin. *J Pineal Res.* 2004;36:1–9.
43. Tricoire H, Moller M, Chemineau P MB. Origin of cerebrospinal fluid melatonin and possible function in the integration of photoperiod. *Reprod Suppl.* 2003;61:311–21.
44. José Miguel Cisneros Herreros, Germán Peñalva Moreno. Melatonina en los trastornos del sueño. *GEF Bull Biosci.* 2010;1(1):1–6.
45. Benloucif S, Burgess HJ, Klerman EB, Lewy AJ, Middleton B, Murphy PJ, et al. Measuring melatonin in humans. *J Clin Sleep Med.* 2008;4(1):66–9.
46. Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJM, Zisapel N, et al. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol.* 2008 Jul;85(3):335–53.
47. Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sánchez N, Rodríguez-Rodríguez A, Guerrero JM. Melatonin: buffering the immune system. *Int J Mol Sci.* 2013 Jan;14(4):8638–83.
48. Reiter RJ, Tan D, Manchester LC, Qi W. Biochemical Reactivity of Melatonin with Reactive Oxygen Species. A Review of the Evidence. *Cell Biochem Biophys.* 2001;34(2):237–56.
49. Galano A, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res.* 2011 Aug;51(1):1–16.

50. Hardeland R. Antioxidative Protection by Melatonin. *Endocrine*. 2005;27(2):119–30.
51. Okatani Y, Wakatsuki A, Shinohara K, Kaneda C, Fukaya T. Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion. *J Pineal Res*. 2001 May;30(4):199–205.
52. Milczarek R, Hallmann A, Sokołowska E, Kaletha K, Klimek J. Melatonin enhances antioxidant action of alpha-tocopherol and ascorbate against NADPH- and iron-dependent lipid peroxidation in human placental mitochondria. *J Pineal Res*. 2010 Sep;49(2):149–55.
53. Gitto E, Karbownik M, Reiter RJ, Tan DUNX, Cuzzocrea S, Chiurazzi P, et al. Effects of Melatonin Treatment in Septic Newborns. *Pediatr Res*. 2001;50(6):756–60.
54. Gitto E, Romeo C, Reiter R, Impellizzeri P, Pesce S, Basile M, et al. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Surg*. 2004 Feb;39(2):184–9.
55. Gitto E, Marseglia L, Manti S, D'Angelo G, Barberi I, Salpietro C, et al. Protective Role of Melatonin in Neonatal Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. 2013;2013:1–6.
56. Alonso-Alconada D, Alvarez A, Arteaga O, Martínez-Ibargüen A, Hilario E. Neuroprotective Effect of Melatonin: A Novel Therapy against Perinatal Hypoxia-Ischemia. *Int J Mol Sci*. 2013 Jan;14(5):9379–95.
57. Fulia F, Gitto E, Cuzzocrea S, Reiter RJ, Dugo L, Gitto P, et al. Increased levels of malondialdehyde and nitrite/nitrate in the blood of asphyxiated newborns: reduction by melatonin. *J Pineal Res*. 2001 Nov;31(4):343–9.
58. GJ. M. The immunotherapeutic potential of melatonin. *Expert Opin Investig Drugs*. 2001;10(3):467–76.
59. Macchi MM, Bruce JN. Human pineal physiology and functional significance of melatonin. *Front Neuroendocrinol*. 2004;25(3–4):177–95.
60. Chahbouni M, Escames G, Venegas C, Sevilla B, García JA, López LC, et al. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and

- nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J Pineal Res.* 2010 Apr;48(3):282-9.
61. Esposito E, Cuzzocrea S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr Neuropharmacol.* 2010 Sep;8(3):228-42.
 62. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS, Markus RP. Pineal melatonin and the innate immune response: the TNF-alpha increase after cesarean section suppresses nocturnal melatonin production. *J Pineal Res.* 2007 Nov;43(4):365-71.
 63. Pontes GN, Cardoso EC, Carneiro-Sampaio MMS, Markus RP. Injury switches melatonin production source from endocrine (pineal) to paracrine (phagocytes) - melatonin in human colostrum and colostrum phagocytes. *J Pineal Res.* 2006 Sep;41(2):136-41.
 64. Tan D, Manchester LC, Sainz RM, Mayo JC, León J, Reiter RJ. Physiological Ischemia / Reperfusion Phenomena and Their Relation to Endogenous Melatonin Production. *Endocrine.* 2005;27(2):149-57.
 65. Panzer a, Viljoen M. The validity of melatonin as an oncostatic agent. *J Pineal Res.* 1997 May;22(4):184-202.
 66. Hevia D, Sainz RM, Blanco D, Quirós I, Tan D-X, Rodríguez C, et al. Melatonin uptake in prostate cancer cells: intracellular transport versus simple passive diffusion. *J Pineal Res.* 2008 Oct;45(3):247-57.
 67. Blask DE, Dauchy RT, Sauer LA. Putting Cancer to Sleep at Night. *Endocrine.* 2005;27(2):179-88.
 68. Srinivasan V, Spence DW, Pandi-Perumal SR, Trakht I, Esquifino a I, Cardinali DP, et al. Melatonin, environmental light, and breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 Apr;108(3):339-50.
 69. Cavanaugh JE, Witt-enderby PA. Mini-review : CNS Melatonin Receptors and Signaling : Focus on Aging- Related Diseases and Future Perspectives. *Open Neuroendocrinol J.* 2010;3:96-104.

70. Yu X, Li Z, Zheng H, Ho J, Chan MTV, Wu WKK. Protective roles of melatonin in central nervous system diseases by regulation of neural stem cells. *Cell Prolif.* 2017;50(2):1–5.
71. Shechter A, Lespérance P, Ng Ying Kin NMK, Boivin DB. Pilot investigation of the circadian plasma melatonin rhythm across the menstrual cycle in a small group of women with premenstrual dysphoric disorder. *PLoS One.* 2012 Jan;7(12):e51929.
72. García JM, Hoyos AM, Carballo AM, García JMF, López EN, Uberos J, et al. Pubertad y melatonina. *An Pediatr.* 2010;57(2):121–6.
73. Sies, Helmut; Berndt, Carsten; Jones DP. Oxidative Stress. *Annu Rev Biochem.* 2017;86:715–48.
74. Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology.* 2011;21(4):401–9.
75. Perrone S, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Oxidative stress and antioxidant strategies in newborns. *J Matern Neonatal Med.* 2010;23(SUPPL. 3):63–5.
76. Frosali S, Simplicio P Di, Giuseppe D Di, Perrone S. Glutathione Recycling and Antioxidant Enzyme Activities in ... *Biol Neonate.* 2004;85:188–94.
77. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2010 Aug;15(4):191–5.
78. Toescu V, Nuttall SL, Martin U, Kendall MJ, Dunne F. Oxidative stress and normal pregnancy. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2002;57(5):609–13.
79. Shoji H, Koletzko B. Oxidative stress and antioxidant protection in the perinatal period. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2019;10(3):324–8.
80. Okatani Y, Okamoto K, Hayashi K, Wakatsuki A, Tamura S, Sagara Y. Maternal-fetal transfer of melatonin in pregnant women near term. *J Pineal Res.* 1998 Oct;25(3):129–34.
81. McGraw K, Hoffmann R, Harker C, Herman JH. The development of circadian rhythms in a human infant. *Sleep.* 1999 May 1;22(3):303–10.

82. Voiculescu SE, Zygouropoulos N, Zahu CD, Zagrean AM. Role of melatonin in embryo fetal development. *J Med Life*. 2014;
83. Muñoz-Hoyos A, Bonillo-Perales A, Avila-Villegas R, González-Ripoll M, Uberos J, Florido-Navío J, et al. Melatonin levels during the first week of life and their relation with the antioxidant response in the perinatal period. *Neonatology*. 2007 Jan;92(3):209–16.
84. Maltepe E, Saugstad OD. Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis--clinical implications. *Pediatr Res*. 2009 Mar;65(3):261–8.
85. Cernada M, Cubells E, Torres-Cuevas I, Kuligowski J, Escobar J, Aguar M, et al. Oxygen in the delivery room. *Early Hum Dev*. 2013 Jun;89 Suppl 1:S11-3.
86. Escobar J, Cubells E, Enomoto M, Quintás G, Kuligowski J, Fernández CM, et al. Prolonging in utero-like oxygenation after birth diminishes oxidative stress in the lung and brain of mice pups. *Redox Biol*. 2013 Jan;1(1):297–303.
87. Martin RJ, Bookatz GB, Gelfand SL, Sastre J, Arduini A, Aguar M, et al. Consequences of neonatal resuscitation with supplemental oxygen. *Semin Perinatol*. 2008 Oct;32(5):355–66.
88. Saugstad OD, Ramji S, Soll RF, Vento M. Resuscitation of newborn infants with 21% or 100% oxygen: an updated systematic review and meta-analysis. *Neonatology*. 2008 Jan;94(3):176–82.
89. Kamlin CO, O'Donnell CP, Davis PG MC. Oxygen saturation in healthy infants immediately after birth. *Jpurnal Pediatr*. 2006;148(5):585–9.
90. Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, García-Sala F VJ. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr*. 2003;142(3):240–6.
91. Wyllie J, Perlman JM, Kattwinkel J, Atkins DL, Chameides L, Goldsmith JP, et al. Part 11: Neonatal resuscitation: 2010 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science with Treatment

- Recommendations. Resuscitation. 2010 Oct;81 Suppl 1:e260-87.
92. Taylor DL, Edwards a D, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol.* 1999;9(1):93-117.
 93. Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2001;13(2):147-53.
 94. Saugstad OD. Oxidative stress in the newborn - A 30-year perspective. *Biol Neonate.* 2005;88(3):228-36.
 95. Kelly RW. Inflammatory mediators and parturition. *Rev Reprod.* 1996 May;1(2):89-96.
 96. Menon R, Bonney EA, Condon J, Mesiano S, Taylor RN. Novel concepts on pregnancy clocks and alarms: Redundancy and synergy in human parturition. *Hum Reprod Update.* 2016;22(5):535-60.
 97. Romero R, Espinoza J, Kusanovic JP, Gotsch F, Hassan S, Erez O, et al. The preterm parturition syndrome. *BJOG.* 2006 Dec;113 Suppl:17-42.
 98. Keelan JA. Intrauterine inflammatory activation, functional progesterone withdrawal, and the timing of term and preterm birth. *J Reprod Immunol.* 2018;125(December 2017):89-99.
 99. Bowen JM, Chamley L, Keelan JA, Mitchell MD. Cytokines of the placenta and extra-placental membranes: Roles and regulation during human pregnancy and parturition. *Placenta.* 2002;23(4):257-73.
 100. Osman I, Young A, Jordan F, Greer IA, Norman JE. Leukocyte density and proinflammatory mediator expression in regional human fetal membranes and decidua before and during labor at term. *J Soc Gynecol Investig.* 2006;13(2):97-103.
 101. Christiaens I, Zaragoza DB, Guilbert L, Robertson SA, Mitchell BF, Olson DM. Inflammatory processes in preterm and term parturition. *J Reprod Immunol.* 2008;79(1):50-7.

102. Díaz-Castro J, Florido J, Kajarabille N, Prados S, De Paco C, Ocon O, et al. A new approach to oxidative stress and inflammatory signaling during labour in healthy mothers and neonates. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015.
103. Fainaru O, Almog B, Pinchuk I, Kupfermanc MJ, Lichtenberg D, Many A. Active labour is associated with increased oxidisibility of serum lipids ex vivo. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2002;109(8):938–41.
104. Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med.* 2004;37(5):724–32.
105. Weinberger B, Nisar S, Anwar M, Ostfeld B, Hegyi T. Lipid peroxidation in cord blood and neonatal outcome. *Pediatr Int.* 2006;48(5):479–83.
106. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* [Internet]. 2010;15(4):191–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.siny.2010.04.001>
107. Tanswell AK, Freeman BA. Pulmonary antioxidant enzyme maturation in the fetal and neonatal rat. II. The influence of maternal iron supplements upon fetal lung catalase activity. *Pediatr Res.* 1984;18(9):871–4.
108. Katzer D, Mueller A, Welzing L, Reutter H, Reinsberg J, Bartmann P, et al. Antioxidative status and oxidative stress in the fetal circulation at birth: the effects of time of delivery and presence of labor. *Early Hum Dev.* 2015;91(2):119–24.
109. Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Flores LJ, Manchester LC, Tan DX, et al. Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol.* 2008;25(3):291–303.
110. Boden MJ, Varcoe TJ, Kennaway DJ. Circadian regulation of reproduction: From gamete to offspring. *Prog Biophys Mol Biol.* 2013;113(3):387–97.
111. Schlabritz-Loutsevitch N, Hellner N, Middendorf R, Müller D, Olcese J. The human myometrium as a target for melatonin. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(2):908–13.

112. Sharkey JT, Puttaramu R, Word RA, Olcese J. Melatonin synergizes with oxytocin to enhance contractility of human myometrial smooth muscle cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(2):421-7.
113. Betran AP, Torloni MR, Zhang JJ, Gülmezoglu AM. WHO statement on caesarean section rates. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol.* 2016;123(5):667-70.
114. Boerma T, Ronsmans C, Melesse DY, Barros AJD, Barros FC, Juan L, et al. Global epidemiology of use of and disparities in caesarean sections. *Lancet.* 2018;392(10155):1341-8.
115. Recursos físicos, actividad y calidad de los servicios sanitarios. Informe Anual del Sistema Nacional de Salud 2018. Ministerio de Sanidad, Consumo y Bienestar Social. 2019 p. 99.
116. Registro de altas hospitalarias del Conjunto Mínimo Básico de Datos (CMBD) de los hospitales del Sistema Nacional de Salud. Información y Estadísticas Sanitarias 2013. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Subdirección General de Informaci. 2013.
117. Hyde MJ, Mostyn A, Modi N KP. The health implications of birth by Caesarean section. *Biol Rev Cambridge Philosophical Soc.* 2012;87(1):229-43.
118. Souza JP, Gülmezoglu A, Lumbiganon P, Laopaiboon M, Carroli G, Fawole B, et al. Caesarean section without medical indications is associated with an increased risk of adverse short-term maternal outcomes: the 2004-2008 WHO Global Survey on Maternal and Perinatal Health. *BMC Med.* 2010 Jan;8(1):71.
119. Hyde MJ, Mostyn A, Modi N, Kemp PR. The health implications of birth by Caesarean section. *Biol Rev.* 2012;87(1):229-43.
120. Hansen AK, Wisborg K, Uldbjerg N HT. Elective caesarean section and respiratory morbidity in the term and near-term neonate. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(4):389-94.
121. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery.

- Surgery. 2000;127(2):117–26.
122. Cho CE, Norman M. Cesarean section and development of the immune system in the offspring. *Am J Obstet Gynecol.* 2013;208(4):249–54.
123. Inanc F, Kilinc M, Kiran G, Guven A, Kurutas EB, Cikim IG AO. Relationship between oxidative stress in cord blood and route of delivery. *Fetal Diagn Ther.* 2005;20(5):450–3.
124. Nejad RK, Goodarzi MT, Shftee G, Pezeshki N, Sohrabi M. Comparison of oxidative stress markers and serum cortisol between normal labor and selective cesarean section born neonates. *J Clin Diagnostic Res.* 2016;10(6):BC01–3.
125. Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovács A, Kovács L, et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2002 Jul 10;103(2):136–9.
126. Paamoni-Keren O, Silberstein T, Burg A, Raz I, Mazor M, Saphier O, et al. Oxidative stress as determined by glutathione (GSH) concentrations in venous cord blood in elective cesarean delivery versus uncomplicated vaginal delivery. *Arch Gynecol Obstet.* 2007 Jul;276(1):43–6.
127. Noh E, Kim Y, Cho M, Kim JW, Byun YJ, T.B. and S. Comparison of oxidative stress markers in umbilical cord blood after vaginal and cesarean delivery. *Obstet Gynecol Sci.* 2014;57(2):109–14.
128. Mutlu B, Aksoy N, Cakir H, Celik H, Erel O. The effects of the mode of delivery on oxidative-antioxidative balance. *J Matern Neonatal Med.* 2011;24(11):1367–70.
129. Watanabe K, Iwasaki A, Mori T, Kimura C, Matsushita H, Shinohara K, et al. Differences in levels of oxidative stress in mothers and neonate: the impact of mode of delivery. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2013;26(16):1649–52.
130. Vakilian K, Ranjbar A. Comparison of cesarean section and normal vaginal delivery using entonox inhalation in terms of oxidative stress indices in newborns and

- mothers. *Int J Women's Heal Reprod Sci.* 2018;6(1):75–9.
131. Fogel I, Pinchuk I, Kupferminc MJ, Lichtenberg D, Fainaru O. Oxidative stress in the fetal circulation does not depend on mode of delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193(1):241–6.
132. Adekanle DA, Oparinde DP, Atiba AS, Akintayo AA. Effect of different modes of delivery on cord blood oxidative stress markers. *Int J Biomed Sci.* 2013;9(4):249–54.
133. Yaacobi N, Ohel G, Hochman A. Reactive oxygen species in the process of labor. *Arch Gynecol Obstet.* 1999;263(1–2):23–4.
134. Hung TH, Chen SF, Hsieh TT ang, Lo LM, Li MJ, Yeh YL. The associations between labor and delivery mode and maternal and placental oxidative stress. *Reprod Toxicol.* 2011;31(2):144–50.
135. Saphier O, Schneid-Kofman N, Silberstein E, Silberstein T. Does mode of delivery affect neonate oxidative stress in parturition? Review of literature. *Arch Gynecol Obstet.* 2013 Mar;287(3):403–6.
136. Work Group on Breastfeeding. Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics.* 2014;31(6).
137. World Health Association. Infant and young child feeding. Infant and young child feeding: modl chapter for medical students and allied health professionals 2009.
138. Olivia Ballard J, Morrow AL. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am.* 2013;60(1):49–74.
139. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* 2015;91(11):629–35.
140. Biesalski HK, Dragsted LO, Elmadfa I, Grossklaus R, Müller M, Schrenk D, et al. Bioactive compounds: Definition and assessment of activity. *Nutrition.* 2009;25(11–12):1202–5.
141. Buescher ES, McIlheran SM. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr*

- Res. 1988 Jul;24(1):14-9.
142. L'Abbe M, Friel J. 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 gastroenterology Nutr.* 2000;31(3):270-4.
143. Matos C, Ribeiro M, Guerra A. Breastfeeding: Antioxidative properties of breast milk. *J Appl Biomed.* 2015;13(3):169-80.
144. Živković J, Sunarić S, Trutić N, Denić M, Kocić G, Jovanović T. Antioxidants and Antioxidant Capacity of Human Milk. *Acta Fac Medicae Naissensis.* 2015;32(2):115-25.
145. Zarban A, Taheri F, Chahkandi T, Sharifzadeh G, Khorashadizadeh M. Antioxidant and radical scavenging activity of human colostrum, transitional and mature milk. *J Clin Biochem Nutr.* 2009 Sep;45(2):150-4.
146. 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(2):133-7.
147. Tsopmo A, Diehl-Jones BW, Aluko RE, Kitts DD, Elisia I FJ. Tryptophan Released From Mother's Milk Has Antioxidant Properties. *Pediatr Res.* 2009;66(6):614-8.
148. Illnerová H, Buresova M, Presl J. Melatonin Rhythm in Human Milk. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;77(3):838-41.
149. Cubero J, Valero V, Sánchez J, Rivero M, Parvez H, Rodríguez AB. The circadian rhythm of tryptophan in breast milk affects the rhythms of 6-sulfatoxymelatonin and sleep in newborn. *Neuroendocrinol Lett.* 2005;26(6):657-61.
150. Cohen Engler A, Hadash A, Shehadeh N, Pillar G. Breastfeeding may improve nocturnal sleep and reduce infantile colic: potential role of breast milk melatonin. *Eur J Pediatr.* 2012 Apr;171(4):729-32.
151. Namll Kalem M, Kalem Z, Yuce T, Baklrarar B, Söylemez F. Comparison of Melatonin Levels in the Colostrum between Vaginal Delivery and Cesarean Delivery. Vol. 35,

- American Journal of Perinatology. 2018. p. 481–5.
152. Lima HK, Vogel K, Hampel D, Wagner-Gillespie M FA. The Associations Between Light Exposure During Pumping and Holder Pasteurization and the Macronutrient and Vitamin Concentrations in Human Milk. *J Hum Lact.* 2020;36(2):254–63.
153. White RD. Circadian Variation of Breast Milk Components and Implications for Care. Vol. 12, *Breastfeeding Medicine.* 2017. p. 398–400.
154. Molad M, Ashkenazi L, Gover A, Lavie-Nevo K, Zaltsberg-Barak T, Shaked-Mishan P, et al. Melatonin stability in human milk. *Breastfeed Med.* 2019;14(9):680–2.
155. Lezcano AC, Longás AF, Fernández DY, Villanova JG, Montejo AR, Copil AC, et al. Estudio transversal español de crecimiento 2008 . Parte I : valores de peso y longitud en recién nacidos de 26-42 semanas de edad gestacional Sujetos y métodos STUDY 2008 . PART I : WEIGHT AND HEIGHT VALUES IN NEWBORNS OF 26-42 WEEKS. 2008;68(6):544–51.
156. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz a G, et al. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990 Jan;186:464–78.
157. Gombert M, Carrasco Garcia A, Carrasco Luna J, Codoñer Franch P. A new procedure for the Antioxidant capacity dpph assessment in small samples. In MDPI AG; 2018. p. 5904.
158. Orsi NM, Tribe RM. Cytokine Networks and the regulation of uterine function in pregnancy and parturition. *J Neuroendocrinol.* 2008;20(4):462–9.
159. Kiriakopoulos N, Grigoriadis S, Maziotis E, Philippou A, Rapani A, Giannelou P, et al. Investigating Stress Response during Vaginal Delivery and Elective Cesarean Section through Assessment of Levels of Cortisol, Interleukin 6 (IL-6), Growth Hormone (GH) and Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1). *J Clin Med.* 2019;8(8):1112.
160. Keelan JA, Marvin KW, Sato TA, Coleman M, McCowan LME, Mitchell MD. Cytokine

- abundance in placental tissues: Evidence of inflammatory activation in gestational membranes with term and preterm parturition. *Am J Obstet Gynecol.* 1999;181(6):1530–6.
161. Bessler H, Kuperman A, Beilin B, Klingler G, Gurary N, Mozes C, et al. Labor affects cytokine production in newborns. *Am J Reprod Immunol.* 1998;39(1):27–32.
162. Hu Y, Huang K, Sun Y, Wang J, Xu Y, Yan S, et al. Placenta response of inflammation and oxidative stress in low-risk term childbirth: The implication of delivery mode. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2017;17(1):1–10.
163. Saugstad OD, Taylor DL, Edwards a D, Mehmet H, Buonocore G, Perrone S, et al. Oxidative stress in the newborn - A 30-year perspective. *Biol Neonate.* 2005;88(2):228–36.
164. Saker M, Soulimane Mokhtari N, 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(2):95–9.
165. Nabhan AF, El-Din LB, Rabie AH, Fahmy GM. Impact of intrapartum factors on oxidative stress in newborns. *J Matern Neonatal Med.* 2009;22(10):867–72.
166. Vakilian K, Ranjbar A, Zarganjfard A, Mortazavi M, Vosough-Ghanbari S, Mashaiee S AM. On the relation of oxidative stress in delivery mode in pregnant women; a toxicological concern. *Toxicol Mech methods.* 2009;19(2):94–9.
167. Şimşek Y, Karabiyik P, Polat K, Duran Z, Polat A. Mode of delivery changes oxidative and antioxidative properties of human milk: a prospective controlled clinical investigation. *J Matern Neonatal Med.* 2015;28(6):734–8.
168. Trávníčková Z, Illnerová H. Melatonin entrainment of the circadian N-acetyltransferase rhythm in the newborn rat pineal gland. *J Pineal Res.* 1997 Oct;23(3):136–41.
169. Müberra Namli Kalem; Ziya Kalem; Tuncay Yuce; Batuban Bakrarrar; Feride Söylemez. Comparison of Melatonin Levels in the Colostrum between Vaginal

- Delivery and Cesarean Delivery. *Am J Perinatol.* 2018;35(05):481–5.
170. Qin Y, Shi W, Zhuang J, Liu Y, Tang L, Bu J, et al. Variations in melatonin levels in preterm and term human breast milk during the first month after delivery. *Sci Rep.* 2019;9(17984):1–5.
171. Hahn-Holbrook J, Saxbe D, Bixby C, Steele C, Glynn L. Human milk as “chrononutrition”: implications for child health and development. Vol. 85, *Pediatric Research.* 2019. p. 936–42.
172. Italianer MF, Naninck EFG, Roelants JA, Horst GTJ Van Der. Circadian Variation in Human Milk Composition. :1–16.
173. Kennaway DJ. A critical review of melatonin assays: Past and present. *J Pineal Res.* 2019;67(1):1–14.
174. Fatma Akin, Betül Kozanhan, Cigdem D. Deniz, Osman Sahi, Halime Goktepe, Salim Neselioglu OE. Effects of the anesthesia technique used during cesarean section on maternal-neonatal thiol disulfide homeostasis. *Minerva Anestesiol.* 2019;85(11):1175–83.
175. Compagnoni G, Lista G, Giuffrè B, Mosca F MA. Coenzyme Q10 levels in maternal plasma and cord blood: correlations with mode of delivery. *Biol Neonate.* 2004;86(2):104–7.
176. Hracsko Z, Safar Z, Orvos H, Novak Z, Pal A, Varga IS. Evaluation of oxidative stress markers after vaginal delivery or Caesarean section. *In Vivo.* 2007;21(4):703–6.
177. Biran V, Decobert F, Bednarek N, Boizeau P, Benoist JF, Claustrat B, et al. Melatonin levels in preterm and term infants and their mothers. *Int J Mol Sci.* 2019;20(9).

