

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

**INSTITUTO DE NUTRICION Y TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA



**ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES  
(COENZIMA Q, TOCOFEROL, RETINOL, ÁCIDO ASCÓRBICO Y  
ÁCIDO ÚRICO) MINERALES Y PERFIL LIPÍDICO EN LECHE  
HUMANA EN DISTINTAS ETAPAS DE SU MADURACIÓN:  
DIFERENCIAS ENTRE LECHE DE MADRES CON PARTO A  
TÉRMINO Y MADRES CON PARTO PREMATURO.**

**Guillermo Rodríguez Navarrete  
Granada, 2009**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Guillermo Rodríguez Navarrete  
D.L.: GR. 3511-2009  
ISBN: 978-84-692-6395-2

**ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES (COENZIMA Q, TOCOFEROL, RETINOL, ÁCIDO ASCÓRBICO Y ÁCIDO ÚRICO) MINERALES Y PERFIL LIPÍDICO EN LECHE HUMANA EN DISTINTAS ETAPAS DE SU MADURACIÓN: DIFERENCIAS ENTRE LECHE DE MADRES CON PARTO A TÉRMINO Y MADRES CON PARTO PREMATURO**

Memoria que presenta el Licenciado **D. Guillermo Rodríguez Navarrete** para aspirar al grado de Doctor en Farmacia

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada bajo la dirección de:

**DIRECTOR PÓSTUMO**

  
Prof. Dr. D. José Quiles Morales

Dr. D. Jose Luis Quiles Morales

Dr. D. Julio José Ochoa Herrera

Dra. Dña. Magdalena López Frías

Ldo. D. **Guillermo Rodríguez Navarrete**,  
aspirante al grado de Doctor en Farmacia  
Granada, 2009

D. José Mataix Verdú, Catedrático de Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

D. José Luis Quiles Morales, Profesor Titular del departamento de Fisiología de la Universidad de Granada

D. Julio José Ochoa Herrera, Profesor Titular del departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

Dña. Magdalena López Frías, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Universidad de Granada.

CERTIFICAN: Que los trabajos de investigación que se exponen en la Memoria de Tesis Doctoral: **“ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES (COENZIMA Q, TOCOFEROL, RETINOL, ÁCIDO ASCÓRBICO Y ÁCIDO ÚRICO) MINERALES Y PERFIL LIPÍDICO EN LECHE HUMANA EN DISTINTAS ETAPAS DE SU MADURACIÓN: DIFERENCIAS ENTRE LECHE DE MADRES CON PARTO A TÉRMINO Y MADRES CON PARTO PREMATURO”**, han sido realizadas bajo nuestra dirección por D. Guillermo Rodríguez Navarrete, en el Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Granada, y la encontramos conforme para ser presentada y aspirar al Grado de Doctor por el Tribunal que en su día se designe.

Y para que así conste, en cumplimiento de las disposiciones vigentes, extendemos el presente en Granada, con fecha trece de Enero de dos mil cinco.



Prof. Dr. D. José  
Mataix Verdú

Dr. D. Jose Luis  
Quiles Morales

Dr. D. Julio José  
Ochoa Herrera

Dra. Dña.  
Magdalena López Frías

**ESTUDIO DEL CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES (COENZIMA Q, TOCOFEROL,  
RETINOL, ÁCIDO ASCÓRBICO Y ÁCIDO ÚRICO) MINERALES Y PERFÍL  
LIPÍDICO EN LECHE HUMANA EN DISTINTAS ETAPAS DE SU MADURACIÓN:  
DIFERENCIAS ENTRE LECHE DE MADRES CON PARTO A TÉRMINO Y  
MADRES CON PARTO PREMATURO**



***IN MEMORIAM***

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Profesor José Mataix Verdú, no podría comenzar este apartado de otra forma que no fuese recordando al que fue mi director, mi maestro y mi amigo. La emotividad del agradecimiento hace que le haya reservado la parte final de los mismos, pero también tenía que ser el primero.

A Julio Ochoa, que ha sabido guiarme con paciencia y buen hacer hasta el final.

A Pepe Quiles, por la serenidad que siempre transmite, que hace que lo difícil siempre parezca fácil.

A Magdalena Lopez Frías, que también me “apadrinó”, derrochando igualmente paciencia y perseverancia.

A mi padre, referente siempre en todo lo personal y profesional.

A mi madre, por su empeño incansable (y a veces poco fructífero) en convertirme cada día en alguien mejor.

A Jose y Javi, mis entrañables hermanos, por el simple hecho de existir.

Al Profesor Tojo, de la Universidad de Santiago de Compostela, un referente en Pediatría que lo es y lo será, y a la Dra. Rosaura Leis, de la misma Universidad.

A Vanessa Dolz, que supo encauzar esta “carrera” desde sus inicios.

A Sandra, por todo el tiempo que pasó conmigo mientras yo lo pasaba con la Tesis. Sé que este agradecimiento no lo compensa, pero igual ayuda...

A Guille, Felipe, Chele, Martini, Luis, Joaquín, Antoñito, Valen, Pedro, Lito, Marta, Mery, Tula, y a todos los amigos/as de los que me he distanciado irremediabilmente en estos 4 últimos años (de alguno no conozco ni a los hijos...pero lo solucionaré!)

Y como no, a mi querido, admirado y añorado Don José, que siempre lo será. A él le debo todos mis conocimientos en Nutrición, y gran parte de otros valores a nivel personal. Todos mis logros profesionales presentes y futuros, si los hay, serán mitad suyos, por haberme inculcado parte de esa capacidad de trabajo que él tenía, la minuciosidad al hacer cualquier cosa, etc.

Solías decir que esta era la última Tesis que dirigirías, pero por ese espíritu incansable de trabajo te hubiera llevado a dirigir quien sabe cuantas más. Solo el destino hizo que de verdad fuese la última, y así me tocará recordarlo.

Solo me queda agradecerte todo lo que me has enseñado, y el hecho de que haya llegado hasta aquí.

## **ABREVIATURAS**

**IgAs:** Inmunoglobulina A secretora

**CDR:** Cantidad Diaria Recomendada

**DHA:** Ácido Docosahexaenoico

**EPA:** Ácido Eicosapentaenoico

**AA:** Ácido araquidónico

**LA:** Ácido linoleico

**LNA:** Ácido  $\alpha$ -Linolénico

**PUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados

**LCPUFA:** Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

**PPAR:** Receptores activados por proliferadores peroxisomales

**FFA:** Free Fatty Acids. Ácidos grasos libres

**SRO:** Especies reactivas de oxígeno

**SOD:** Superóxido dismutasa

**CAT:** Catalasa

**ECN:** Enterocolitis necrotizante

**ERO:** Especies reactivas de oxígeno

**CA:** Capacidad antioxidante

**RL:** Radical libre

**NEC:** Enterocolitis necrotizante

**ROP:** Retinopatía del prematuro

**GSSG:** Glutation disulfato oxidado

**GR:** Glutation reductasa

**GSH:** Glutation reducido

## ÍNDICE

<b>I.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
<b>II.- ANTECEDENTES.....</b>	<b>11</b>
<b>1.- LACTANCIA MATERNA.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1 Importancia de la lactancia materna.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1.1.- Importancia para el niño.....</b>	<b>12</b>
A.- Emocional	
B.- Disminución de la mortalidad	
C.- Sistema inmune	
D.- Función masticatoria y respiratoria	
E.- Enfermedades crónicas	
F.- Desarrollo cognitivo y psicomoto	
G.- Obesidad	
<b>1.1.2.- Importancia para la madre.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.- Composición de la leche materna.....</b>	<b>19</b>
<b>1.2.1.- Leche preparto o precalostro.....</b>	<b>21</b>
<b>1.2.2.- Calostro.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2.3.- Leche de transición.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.4.- Leche madura.....</b>	<b>26</b>
<b>1.2.4.1.- Macronutrientes.....</b>	<b>27</b>
1.2.4.1.- Energía	
1.2.4.2.- Hidratos de carbono	
1.2.4.3.- Proteína	
1.2.4.4.- Grasa	
1.2.4.4.1.- Importancia de los LCPUFA	

<b>1.2.4.2.- Micronutrientes.....</b>	<b>49</b>
1.2.4.2.1.- Vitaminas	
1.2.4.2.2.- Minerales	
<b>1.2.4.3.- Otros componentes.....</b>	<b>58</b>
1.2.4.3.1.- Isoflavonas	
1.2.4.3.2.- Hormonas	
<b>1.2.5.- Cambios de composición en la leche materna.....</b>	<b>59</b>
<b>1.2.6.- Influencia de la dieta materna en la composición         de la leche.....</b>	<b>60</b>
<b>2.- ESTRÉS OXIDATIVO EN EL RECIÉN NACIDO.....</b>	<b>63</b>
<b>2.1.- Radicales libres. Definición y recuerdo histórico.....</b>	<b>68</b>
<b>2.1.1.- Tipos de radicales libres.....</b>	<b>70</b>
2.1.1.1.- Radical superóxido.	
2.1.1.2.- Peróxido de hidrógeno.	
2.1.1.3.- Radical hidroxilo.	
2.1.1.4.- Oxígeno singlete.	
<b>2.1.2.- Defensas endógenas contra la acción de los radicales         libres.....</b>	<b>74</b>
2.1.2.1.- Mecanismos enzimáticos.....	<b>75</b>
A. Catalasa	
B. Superóxido dismutasa	
C. Glutación peroxidasa	
D. Glutación reductasa	
2.1.2.2.- Mecanismos no enzimáticos.....	<b>80</b>
A. Vitamina E (alfa-tocoferol)	
B. Ubiquinona (coenzima Q <sub>10</sub> )	
C. β-carotenos	
D. Ácido ascórbico (Vitamina C)	
E. Melatonina (aMT)	
F. Otros antioxidantes	

- 2.1.2.3.- Mecanismos de reparación del estrés oxidativo
- 2.1.2.4.- Utilidad de los antioxidantes en el embarazo.

**2.2.- Implicaciones de los radicales libres en el embarazo, parto y neonato..... 92**

**2.2.1.- Embarazo y parto..... 92**

- A. Transferencia de gases entre feto y placenta.
- B. Óxido nítrico.
- C. Parto pretérmino.
- D. Preeclampsia.
- E. Rotura prematura de membranas.
- F. Diabetes gestacional.

**2.2.2.- Neonato..... 112**

- 2.2.2.1. Adaptación postnatal a la hiperoxia.
- 2.2.2.2. Capacidad antioxidante en el periodo neonatal.
- 2.2.2.3. Patologías en neonatos por radicales libres.
  - a. Retinopatía del prematuro.
  - b. Displasia broncopulmonar.
  - c. Fenilcetonuria
  - d. Hipertensión pulmonar persistente neonatal.
  - e. Persistencia del ductus arterioso.
  - f. Enterocolitis necrotizante (ECN).
  - g. Encefalopatía hipóxico-isquémica.

**3.- PAPEL DE LA LECHE MATERNA EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE DEL RECIEN NACIDO..... 125**

## **II.- MATERIAL Y MÉTODOS**

<b>1.- PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS.....</b>	<b>129</b>
<b>2.- APARATOS DE USO GENERAL.....</b>	<b>129</b>
<b>3.- SOFTWARE ESPECÍFICOS.....</b>	<b>131</b>
<b>4.- GRUPOS EXPERIMENTALES.....</b>	<b>131</b>
<b>5.- DISEÑO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>133</b>
<b>6.- DATOS DIETÉTICOS DE LAS MADRES.....</b>	<b>134</b>
<b>7.- TOMA DE MUESTRAS.....</b>	<b>135</b>
<b>8.- DETERMINACIONES REALIZADAS.....</b>	<b>135</b>
<b>8.1.- Capacidad antioxidativa total</b>	
<b>8.2.- Cuantificación de retinol, tocoferoles y coenzimas Q<sub>10</sub> y Q<sub>9</sub> mediante HPLC.</b>	
<b>8.3.- Determinación de ácido úrico y ácido ascórbico mediante HPLC.</b>	
<b>8.4.- Determinación del perfil lipídico en leche materna</b>	
<b>8.5.- Determinación de colesterol</b>	
<b>8.6.- Determinación de minerales</b>	
<b>9.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO.....</b>	<b>143</b>
<b>IV.- RESULTADOS y DISCUSIÓN.....</b>	<b>147</b>
1.- Niveles de CoQ <sub>10</sub> en leche materna.....	
<b>150</b>	
2.- Niveles de tocoferoles en leche materna.....	<b>152</b>
3.- Niveles de retinol en leche materna.....	<b>155</b>
4.- Niveles de ácido ascórbico y ácido úrico en la leche materna.....	<b>157</b>
5.- Capacidad antioxidante total.....	<b>159</b>
6.- Contenido en minerales en leche materna.....	<b>162</b>
6.- Perfil lipídico de las leches maternas.....	<b>167</b>
7.- Contenido en colesterol de la leche materna.....	<b>176</b>
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>181</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>185</b>

# *CAPITULO I*

---

## **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

## **I.- JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

La leche materna es el alimento ideal para todo recién nacido ya que aporta los nutrientes necesarios para un correcto desarrollo y crecimiento del mismo. Durante los primeros estadios del desarrollo del lactante, los factores nutricionales presentan efectos importantes e inmediatos sobre el crecimiento, composición y funciones corporales, ya que el recién nacido muestra exiguos depósitos endógenos de un número determinado de sustratos esenciales, siendo esto debido en muchos casos a la inmadurez de numerosas vías metabólicas y funciones fisiológicas (*Tojo, 2001; Mataix y López-Frías 2009*).

La existencia de esta citada inmadurez hace de la leche materna un alimento imprescindible que aporta al recién nacido una defensa adicional frente al desarrollo de diversas patologías. Entre estas enfermedades se encuentran las agrupadas bajo el término de "enfermedades neonatales por radicales oxigénicos" (*Romero Alvira et. al., 1992; Kelly, 1993; Palomino, 1998*), presentes fundamentalmente en los recién nacidos pretérmino. Este grupo de patologías muestra su inicio en el fuerte estrés oxidativo al que se ve sometido el recién nacido en el momento del nacimiento (*Deligné et. al, 1990; Huertas et al, 1997; Metsvaht et al, 1999*).

Debido al paso de un ambiente intrauterino, con una presión de oxígeno baja a un ambiente extrauterino, con una presión de oxígeno casi cinco veces superior, así como a diversos procesos implicados en la propia finalización de la gestación y el propio trabajo de parto, el recién nacido se enfrenta a una elevada concentración de radicales libres (*Saugstad, 1990; Metsvaht et al, 1999*). Esta incrementada producción de radicales libres debe de ser controlada por el sistema de defensa antioxidante del neonato, cuya maduración corre paralela al desarrollo de la gestación (*Ripalda et. al, 1989; Frank et. al, 1996*), siendo esta la causa de que los recién nacidos prematuros muestren mayor agresión oxidativa, al presentar un sistema de defensa antioxidante más inmaduro (*Bohles, 1997; Thibeault, 2000, Ochoa et.al, 2003*).

Frente al citado daño oxidativo, la madre ayuda en un principio al feto a protegerse de la agresión que sufrirá en el momento del parto, mediante un traspaso de sustancias antioxidantes tales como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, beta-carotenos y coenzima Q a través de la placenta (*Gopinathan et al, 1994; Jain et al, 1996; Bohles, 1997*) y posteriormente al recién nacido mediante el aporte de sustancias antioxidantes a través de la leche materna (*Thomas et al, 1981; Chappell et al, 1985; L`Abbe et al, 2000; Friel et al, 2002*).

En el sentido expuesto, la leche materna parece adaptar su composición al grado de estrés oxidativo existente en el recién nacido, mostrando unos mayores niveles de las vitaminas antioxidantes A, E y C en la leche secretada horas después del parto, es decir el calostro (*Jansson et.al, 1981; Chappell et al, 1985; Emmett and Rogers, 1997; Gossage et al, 2002*), lo cual coincide con los mayores niveles de radicales libres en el recién nacido (*Huertas et al, 1997; Ochoa et al, 2003*). Posteriormente se van reduciendo estas concentraciones a lo largo de las diversas etapas de la lactación (leche de transición y leche madura), lo cual vuelve a coincidir con el descenso en los radicales libres observado en los neonatos, al menos en lo que se refiere a los recién nacidos a término (*Huertas et al, 1997; Ochoa et al, 2003*). Incluso con respecto al recién nacido prematuro, la leche materna varía su composición. Así, la leche proveniente de madres que han dado a luz prematuramente es una leche, en general, mas rica en proteínas y energía (*Aguayo, 2002*) y con respecto a las defensas antioxidantes, parece presentar un mayor contenido en  $\alpha$ -tocoferol, así como en algunos enzimas antioxidantes (glutacion peroxidasa) (*Chappell et al, 1985; Ellis et al, 1990*), lo cual en parte podría ser debido a un intento por parte de la madre de incrementar las defensas en el recién nacido prematuro.

Aunque las ventajas de la lactación con leche materna son evidentes, por diversas razones, bien fisiológicas bien sociales, los lactantes que no pueden ser alimentados con leche materna y los sustitutos de esta pasan a ser esenciales para la supervivencia de estos lactantes. Así, se han desarrollado sustitutos de la leche materna a partir de leche no tratada de otras especies de

mamíferos, fundamentalmente leche de vaca, transformándolas mediante una serie de modificaciones en las fórmulas complejas que se comercializan en la actualidad. Estas fórmulas lácteas adaptadas intentan mimetizar en todo lo posible la leche materna, o en su caso los efectos funcionales de la misma, ya que como hemos comentado anteriormente, la leche materna muestra una composición marcada por las necesidades que el lactante tiene para un desarrollo y crecimiento normales.

La utilización, en muchos casos inevitable, de esta nutrición artificial, hace que sea necesario conocer lo más perfectamente posible la composición de la leche materna, sobre todo en su contenido en moléculas antioxidantes, ya que algunas investigaciones parecen indicar que estas fórmulas lácteas infantiles proporcionan una menor defensa antioxidante (*Friel et. al., 2002*). Sin embargo, aun existen componentes con actividad antioxidante cuya concentración o incluso cuya existencia o no en la leche materna es totalmente desconocida. Entre estos componentes se encuentra una molécula de gran importancia hoy en día, el coenzima Q o ubiquinona.

El coenzima Q (CoQ) o ubiquinona (2,3 dimetoxi-5-metil, 6-poliprenilbenzoquinona) es una benzoquinona que presenta en su unidad 6 una cadena lateral constituida por un número variables de unidades isoprenoides. Esta molécula lipofílica está presente en prácticamente todas las membranas celulares, en el interior hidrofóbico de la bicapa fosfolipídica de las mismas. El CoQ mayoritario en humanos y otros mamíferos de larga vida, como es la vaca, es el CoQ<sub>10</sub> (contiene 10 unidades isoprenoides) (*Battino et al, 1990*).

Son varias las funciones bioquímicas asignadas a esta molécula (*Crane, 2000*), aunque las más reconocidas y mejor estudiadas son la de ser componente de la cadena de transporte de electrones y la de constituir un poderoso antioxidante. La ubiquinona, se encarga de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria mitocondrial desde los complejos I y II al complejo III y la translocación de protones a través de la membrana interna mitocondrial (*Crane, 1989; Ernster and Dallner, 1995*). Con respecto a su

capacidad antioxidativa, han sido varios los modelos de actuación sugeridos que implican tanto una acción directa de esta molécula sobre los radicales libres como un mantenimiento del *pool* activo de vitamina E a través de la reducción del radical tocoferoxilo, siendo este último el mecanismo antioxidante más reconocido (*Kagan et al, 1995; Crane, 2000*).

Su amplia distribución en el organismo, así como sus importantes funciones bioquímicas han dado lugar a que sean múltiples los estudios que muestran un efecto beneficioso de esta molécula en diversas patologías y procesos fisiológicos, tales como cardiomiopatías, degeneración macular asociada a la edad, enfermedades neurodegenerativas, cáncer, aterosclerosis, envejecimiento, ejercicio físico, etc. (*Quiles JI et. al., 1994; Litarru et al, 1995; Ramírez-Tortosa et al, 1997*), patologías y procesos que, en general, muestran un importante componente oxidativo.

Dada la importancia de esta molécula en la defensa antioxidante en general y en la posible participación en la específica del neonato resulta de gran interés el conocer su concentración en la leche materna ya que actualmente no existe información alguna a este respecto. Siendo por lo tanto necesario estudiar su concentración en la leche humana, tanto por un aspecto científico como por un aspecto de salud del recién nacido, ya que como hemos comentado anteriormente en muchos casos es inevitable el uso de fórmulas adaptadas par infantes, las cuales han de ser lo más semejante posibles a la leche materna y por lo tanto contener todas aquellas sustancias beneficiosas que esta leche contiene.

Los **objetivos** de esta tesis son, por tanto:

**1º) Estudiar el contenido en coenzima Q en la leche humana en los diferentes estadios o etapas de la lactación (calostro, transición y madura), tanto la procedente de madres de niños pretérmino como la procedente de madres de niños nacidos a término.**

En este sentido, es importante conocer posibles variaciones en el contenido de esta molécula en la leche materna a lo largo de las diferentes etapas de la lactación (calostro, transición y madura), así como diferencias en cuanto al contenido en coenzima Q entre leches provenientes de madres que han tenido un parto prematuro y madres que han tenido un parto a término.

**2º) Observar la posible relación del coenzima Q en leche humana con otros antioxidantes liposolubles (retinol, carotenos y vitamina E) y el perfil lipídico de la misma.**

El coenzima Q, aunque muestra diversas funciones bioquímicas, una de las más estudiadas en los últimos años es su capacidad como antioxidante. Por eso es interesante comprobar si el coenzima Q sufre modificaciones a lo largo de las etapas de la lactación como las encontradas con otros antioxidantes liposolubles, así como su posible relación con el perfil lipídico de la leche materna.

**3º) Evolución del contenido en *ácido ascórbico* y *ácido úrico* de la leche humana a lo largo de los diferentes estadios o etapas de la lactación, en leches provenientes de madres que han tenido un parto prematuro y madres que han tenido un parto a término.**

**4º) Estudio de la capacidad antioxidante total (CAT) de la leche humana a lo largo de las etapas de la lactación, en leches provenientes de madres que han tenido un parto prematuro y madres que han tenido un parto a término**

**5º) Evolución del contenido en minerales en leche humana a lo largo de las etapas de la lactación, en leches provenientes de madres que han tenido un parto prematuro y madres que han tenido un parto a término.**

**6º) Perfil lipídico de la leche humana a lo largo de los diferentes estadios o etapas de la lactación, en leches provenientes de madres que han tenido un parto prematuro y madres que han tenido un parto a término.**

**7º) Evolución del contenido en colesterol de la leche humana a lo largo de las etapas de la lactación, en leches provenientes de madres que han tenido un parto prematuro y madres que han tenido un parto a término**

Estos objetivos, tanto los primarios como los secundarios, nos permitirán conocer mejor la composición de la leche materna ya que como hemos comentado, en muchas ocasiones esta leche es sustituida por fórmulas lácteas infantiles, las cuales deben asemejarse lo más perfectamente posible a la leche a la que sustituyen. Además, nos aportan una información muy valiosa sobre el sistema de defensa antioxidante presentado por esta leche, lo cual es de gran importancia dado el estrés oxidativo al cual se ve sometido el recién nacido durante el parto y primeros días de vida, especialmente en el caso del recién nacido prematuro.

## CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

### 1.- LACTANCIA MATERNA

#### 1.1.- Importancia de la lactancia materna

Durante el primer año de vida se dan circunstancias fisiológicas especiales que diferencian esta etapa de cualquier otra. Éstas son, entre otras, un crecimiento y maduración muy rápidos, lo que condiciona que las necesidades energéticas sean elevadas (*Hidalgo MI, Martínez V, 2008*). Existe además una inmadurez de los diferentes órganos y sistemas, y una mayor exposición a alteraciones del equilibrio hidromineral, sobrecargas renales, alteraciones térmicas, infecciosas, etc.

Todo ello hace que cualquier alteración en el aporte de nutrientes pueda originar una parada en el crecimiento, y un retraso madurativo que será más importante cuanto más precoz sea esta.

La lactancia materna constituye la alimentación idónea para el crecimiento y desarrollo saludable del lactante. Se recomienda de forma exclusiva durante los 5 o 6 primeros meses, y combinada con alimentos complementarios hasta los 2 años o más, tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo (*Vennemann MM et al, 2009*).

A día de hoy, existen suficientes evidencias científicas que avalan los beneficios de la leche humana frente a la alimentación artificial en niños, y lo que es más, estos beneficios no son solo visibles en la infancia, sino que se constatan a lo largo de toda la vida, abarcando múltiples aspectos de salud tanto en niños como en madres, y como se dijo antes, tanto en países ricos como pobres (*Muñoz MT, Hidalgo MI, Clemente J, 2008*).

### **1.1.1.- Importancia para el niño**

#### **A. Emocional:**

La alimentación al pecho no solo proporciona una dieta óptima y una importante protección inmunológica al recién nacido, sino que también contribuye a una notable unión emocional con la madre. Esta interacción madre-niño es de vital importancia para el establecimiento de una unión emocional (*Klaus M, Jeraud J, Kreger W y cols, 1972*).

El contacto piel a piel tras el nacimiento, además, facilita un desarrollo exitoso de la lactancia (*Sosa R, Kennel JH, Klaus M y cols, 1976*) aumentando su frecuencia y duración (*Chateau P de, Holmberg H, Jakobson K y cols, 1977*) si este se prolonga por más de 50 minutos, al producir un posterior reconocimiento del olor de la propia madre (*Mizuno y cols, 2004*).

#### **B. Disminución de la mortalidad**

En los países donde se ha promocionado la lactancia materna, la mortalidad ha descendido entre 3 y 5 veces frente a los niños que recibieron fórmulas de inicio (*Moreland J, Coombs J, 2000*). Concretamente en Inglaterra, un programa de prevención realizado en 2006 se asoció como factor individual de protección frente a la mortalidad postnatal y perinatal con un descenso del 5,2 por 1000.

#### **C. Sistema inmune**

En el momento del nacimiento, se encuentran en el niño la totalidad de componentes del sistema inmunitario, solo que se encuentran parcialmente desarrollados. La leche materna actúa como modulador del sistema inmunológico del recién nacido y del lactante, disminuyendo las infecciones, alergias y otras enfermedades mediadas por la inmunidad que pueda padecer a lo largo de su vida (*Warner JO, 2009*).

En relación a la profilaxis frente a alergias, concretamente en cuanto a enfermedades atópicas, un estudio sobre 236 lactantes sanos seguidos durante el primer año de vida, y luego periódicamente hasta los 17 años, demostró el efecto beneficioso de la lactancia materna para la profilaxis del eccema atópico (*Saarinen y Kajosaari, 1995*).

Parece probable que factores microbianos y ambientales modulan las respuestas inmunes del feto y recién nacido e influyen en el desarrollo precoz de la tolerancia oral en la infancia (*Latineen SJ, 2009*). La leche materna promueve un medio intestinal rico en lactobacilos y bifidobacterias, bacterias que inducen un desplazamiento hacia un perfil de citocinas predominante en TH1. Los productos bacterianos son importantes mediadores de la tolerancia oral interactuando con células dendríticas o macrófagos (*Heine RG, Hill DJ, Hosking CS, 2004*)

#### **D. Importancia en la función masticatoria y respiratoria**

La lactancia materna influye de una forma determinante en el desarrollo de la función masticatoria y respiratoria

El niño al nacer, presenta todo un sistema que lo dispone para succionar, la forma mandibular, la dirección en que se disponen los músculos que intervienen en este proceso, así como también otras circunstancias, como la ausencia de dientes, favorecen los movimientos mandibulares hacia delante y hacia atrás, lo que origina que el bebé succione el pecho de su madre (*Lau C, 2007*).

Al efectuar los movimientos mandibulares de avance y retroceso, este ejercicio continuo, preparará sus músculos masticatorios y todo su sistema, para que vaya adquiriendo el tono y desarrollo necesario para cuando aparezcan sus primeros dientes, por consecuencia podemos decir que la lactancia es la mejor preparación para una correcta masticación, en el futuro (*Amaizu N et al, 2003*).

Se puede también mencionar que esta función, refuerza y mantiene el circuito de respiración nasal fisiológico, ya que el niño al estar amamantándose, respira por la nariz, realizando una perfecta coordinación que le permite respirar, succionar y deglutir de una manera rítmica, sin necesidad de soltar el pecho de su madre (*McGain GC, 2005*)

Una respiración nasal adecuada permitirá un correcto desarrollo craneofacial del niño. Como podemos comprender, la lactancia materna, representa, sin lugar a dudas, una influencia significativa, para el desarrollo y maduración de los sistemas masticatorio y respiratorio del recién nacido, lo cual, le ayudará a evitar muchos problemas en el futuro (*Karmaus W y col, 2008*).

#### **E. Enfermedades crónicas**

La lactancia materna protege frente a la diabetes mellitus tipo I, enfermedad celíaca, enfermedad inflamatoria intestinal (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa), algunos tipos de cáncer, asma, y otros problemas crónicos de salud (*Lodge CJ y col, 2008*).

En cuanto a la diabetes, existe una clara disminución del riesgo a padecerla en niños alimentados al pecho (*Mayer EJ, Hamman RF, Gay EC y cols, 1988*). La razón podría ser una similitud estructural entre las proteínas de la leche de vaca y las células  $\beta$ -pancreáticas que condujese a una reactividad cruzada inmunológica (*Harrison LC, 1996*). También se ha puesto de manifiesto que la insulina bovina presente en la leche de vaca podría inmunizar frente a la insulina humana (*Vaarala O, Paronen J, Otonkoski T y col, 1998*).

En cuanto a la enfermedad celíaca, un estudio sueco comprobó que la introducción gradual de alimentos con gluten en la dieta de niños mientras aun seguían lactancia materna, redujo el riesgo de enfermedad celíaca en la primera infancia y posterior crecimiento (*Ivarsson A, Hernell O, Stenlund Hy cols, 2002*)

Por último, respecto a la enfermedad de Crohn, el resultado de un meta-análisis conducido por *Eyal Klement y cols.* en 2004, apoya la hipótesis de que la lactancia materna va asociada a un menor riesgo de padecer tanto esta enfermedad, como la colitis ulcerosa.

## **F. Desarrollo cognitivo y psicomotor**

Existe una gran evidencia del aumento en la función cognitiva de niños amamantados al pecho (*Anderson JW, Johnstone BM, Remlay DT, 1999*), concretamente de 3,16 puntos en la escala de Weschler (IC 2,35-3,98). Estas diferencias se duplican cuando se trata de niños con bajo peso para su edad gestacional o prematuros y podría estar en relación con la presencia en la leche materna de nutrientes requeridos para el desarrollo cerebral como los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (en adelante LCPUFAS).

En un estudio de *Lucas y cols.*, en 1992, sobre 300 niños nacidos con un peso por debajo de 1850 g se demostró que los lactantes que habían consumido leche materna en las primeras semanas de vida tenían un coeficiente mayor a los 7,5-8 años que los que habían recibido fórmulas artificiales.

Otros estudios señalan que los niños alimentados al pecho durante 5 o más meses, alcanzan un desarrollo cognitivo con niveles superiores en las pruebas de integración visual-motora a los 56 meses de edad que los que habían sido alimentados con la misma alimentación pero con una duración menor a esos 5 meses (*Niemelä A, Järvenpää A-L, 1996*).

Además, se observa un mayor desarrollo de la función visual, una más temprana adquisición de las habilidades motoras, menos problemas emocionales y de conducta, y menores problemas neurológicos en el transcurso de su vida.

En el niño con parto pretérmino, la disminución de infección sistémica grave, la reducción del riesgo de enterocolitis necrotizante, el mejor vínculo familiar, y la mejora del desarrollo visual y cognitivo, hacen de la leche materna no solo un nutriente, sino un tratamiento más para mejorar los logros globales respecto a este tipo de niños en las unidades neonatales (*Doyle LW, Rickards AL, Kelly EA y cols, 1992*).

Se ha sugerido que esta mejora de las habilidades cognitivas y psicomotoras, no solo depende de la lactancia materna, sino de que esta se haga directamente del pecho de la madre. Los lactantes que han recibido leche materna directamente del pecho de su madre muestran niveles mejores de CI que los que han recibido leche materna obtenida por extracción, por tanto, ello sugiere que la acción beneficiosa iría ligada más al acto de la administración directa que a la propia lactancia (*Jacobson SW, Jacobson JL, 2002*).

Es obvio pensar por tanto que no sea solo una cuestión nutricional, sino algo más complejo, y que la clave sea al resultado de la integración de diversos factores de tipo genético, ambiental, emocional y trófico.

## **G. Obesidad**

Los niños alimentados con leche materna crecen más rápido durante los primeros dos meses, sin embargo esto se invierte a partir de los 3 y hasta los 12 meses. Así, los niños alimentados con fórmulas tienen una mayor presencia de grasa en su composición corporal. La obesidad en la adolescencia se asocia a un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, problemas ortopédicos, pérdida de autoestima y consecuencias socioeconómicas adversas en la edad adulta (*O'Tierney PF et al, 2009*).

Estudios epidemiológicos de finales del siglo pasado en Alemania, mostraban que un 3,8% de los niños amamantados exclusivamente con leche materna durante dos meses eran obesos, mientras que tan solo lo eran un 0,8% de los que lo habían hecho durante más de 12 meses. En los niños que

nunca recibieron leche materna, el porcentaje subía al 4,5% (Von Kries R, Koletzko B, Sauerwald T y cols, 1999). En la misma línea iban los resultados obtenidos por Lucas et al en 1980, en un estudio sobre 9000 niños, de edades entre 5 y 6 años, y reflejados en la **Tabla 1**.

**Tabla 1.- Porcentaje de obesidad y sobrepeso respecto a la duración de la lactancia materna**

<b>LACTANCIA MATERNA (Meses)</b>	<b>OBESIDAD Y SOBREPESO (%)</b>
<b>0</b>	<b>17</b>
<b>&lt; 2</b>	<b>15</b>
<b>3 – 5</b>	<b>11</b>
<b>6 – 12</b>	<b>9</b>
<b>&gt; 12</b>	<b>6</b>

Fuente: Lucas et al, Lancet 1980

Esta aparente evidencia se ha demostrado en múltiples estudios que incluso han llegado a descartar que existan factores socioeconómicos que pudieran afectar a la conclusión final (Toschke AM, Vignerova J, Lhotaska L y cols, 2002)

A este nivel, uno de los papeles fundamentales en cuanto a la regulación del aporte energético de los niños amamantados al pecho parece jugarlo la leptina. Es por ello que estos niños parecen tener una capacidad diferencial para regular el aporte alimentario, tanto en la lactancia como en edad más avanzada, cuando la dieta incluye alimentos sólidos (Locke R, 2002). Los estudios realizados en este sentido sugieren que la presencia de leptina en leche materna tiene un efecto positivo sobre la saciedad y la regulación del aporte energético. El papel de la leptina en la lactancia materna sucede al de la leptina placentaria, y además, contribuye también a la angiogénesis,

metabolismo óseo y crecimiento. La complejidad de la composición de la leche materna, que será analizada en el punto 2, y su interacción con otros factores bioactivos, contribuye justamente a su óptimo efecto.

### 1.1.2.- Importancia para la madre

Los beneficios de la lactancia materna no sólo favorecen al recién nacido sino que también aporta a la madre beneficios hormonales, físicos y psicológicos (*Heinig MJ, Dewey KG, 1997*).

- Disminuye el sangrado posparto, disminuyendo la incidencia de transfusiones. Esto se debe a que aumentan las concentraciones de oxitocina, lo que estimula las contracciones del útero, ayudando a que regrese a su tamaño normal (involución uterina), y reduciendo en gran medida el citado sangrado posparto de la madre, facilitando su recuperación (*Heinig MJ, Dewey KG, 1997*).
- Es un buen método anticonceptivo siempre que el bebé tenga menos de 6 meses, la madre siga en amenorrea, y la lactancia sea exclusiva sin hacer pausas de más de 6 horas (*Dobbing J, 1985; Mc Neilly AS, 1993*). No resulta del todo fiable, pero no se puede negar que resulta, al menos, económico. En muchos países en vías de desarrollo, esos pocos meses de infertilidad ejercen una regulación demográfica de vital importancia.
- Reduce el riesgo de cáncer de ovario y cáncer de mama premenopáusico (*Newcomb PA, Egan KM, Titus-Ernstoff et al, 1999*). De hecho, a día de hoy, es la única forma de prevención primaria de este cáncer (*Rosenblatt KA, Thomas DB, 2003*). Amplios estudios poblacionales han establecido dicha disminución del riesgo hasta en un 4,3% por cada 12 meses de lactancia materna, a la que se sumaría un 7,0% por cada nacimiento. En los países industrializados, el riesgo de cáncer de mama es mayor debido a la baja tasa de fertilidad de las mujeres y a los cortos períodos de amamantamiento.

- Disminuye el riesgo de fractura de cadera y osteoporosis en el periodo posmenopáusico (*Melton LJ, 1993*)
- Ayuda a perder el peso ganado por las madres durante el embarazo más rápidamente (*Dewey et al, 1993*). Los mecanismos que favorecen el uso de los depósitos de grasa maternos parecen presentarse durante la lactancia. Esta disminución de peso es paulatina, más evidente a partir de los 3 meses de lactancia y localizada preferentemente en la zona de caderas y cintura. Durante la lactancia, la lipoprotein-lipasa disminuye su actividad a nivel del tejido graso de la madre, mientras que la incrementa en la glándula mamaria, al producirse en ella la síntesis de lípidos para la leche (*Mcnamara JP, 1995*).
- Menor probabilidad de sufrir depresión posparto (*Einarson A, 2008*).
- Por último, ayuda y mejora el vínculo madre-hijo, y parece producir en la madre un aumento de la autoestima, además de reforzar los lazos de unión con los hijos (*Kuzela A, Stifter C, Worobey J, 1990*)

## 2.- Composición de la leche materna

La leche humana empieza a secretarse unas horas después del parto, denominándose a esa primera secreción calostro. Pasados de uno a tres días, la secreción láctea va modificándose tanto en su consistencia como en su composición, recibiendo entonces el nombre de leche de transición, y pasados tres a siete días, secreta lo que se denomina leche madura.

La composición en macronutrientes de distintas leches de hembras de mamíferos, como se observa en la **Tabla 2**, es sustancialmente distinta, pues diferentes son asimismo los requerimientos de las crías correspondientes (*Rodríguez-Palmero M et al, 1999*). Este hecho ya indica una evidente consideración nutricional: la leche de una especie sólo es completamente

válida para su cría y la utilización de otra distinta para alimentar a ésta no es recomendable, hasta el punto de que sus efectos pueden ser tan deletéreos que conduzcan a la muerte cuando se administren un tiempo más o menos prolongado (*Mataix J, Lopez Frías M, 2009*).

**Tabla 2.- Composición de la leche de diversos mamíferos respecto al crecimiento de sus crías**

Especie	Días para duplicar peso	CONTENIDO EN LECHE (%)			
		Grasa	Proteína	Lactosa	Cenizas
Mujer	180	3,8	0,9	7,0	0,2
Yegua	60	1,9	2,5	6,2	0,5
Vaca	47	3,7	3,4	4,8	0,7
Cabra	19	4,5	2,9	4,1	0,8
Oveja	10	7,4	5,5	4,8	1,0
Rata	6	15,0	12,0	3,0	2,0

Otra consecuencia que se obtiene de la composición específica de la leche humana es que constituye la mejor referencia para conocer los requerimientos del lactante, y por tanto de la composición que deben tener las fórmulas adaptadas.

La composición de este fluido es dinámica, viva y cambiante, con un coeficiente de variación en alguno de sus componentes de hasta un 30% (*Bueno M, Bueno O, Lázaro A, 2007*) y obedece a mecanismos de regulación neuroendocrina (*Neville MC, 1991*) donde desempeñan un papel importante células, nutrientes y sustancias químicas (*Mardones F, Fanta E, Paris E, 1991*).

Sus constituyentes se distribuyen en varios compartimentos: una fase acuosa con sustancias en solución (87%), dispersiones coloidales de moléculas de caseína (0,3%), emulsiones de glóbulos de grasa (4%), y glóbulos de grasa en membranas y células vivas (8,96%).

Tiene una gran complejidad biológica, ya que está compuesta por nutrientes, sustancias inmunológicas, hormonas, enzimas, factores de crecimiento, etc (*Hanson LA, Korotkova M, Lundin S et al, 2003*).

Es capaz también de adaptarse a las diferentes circunstancias de la madre.

Se trata por tanto de un alimento extremadamente complejo y aun cuando fuese factible imitar artificialmente o biotecnológicamente todos sus componentes, no se podría lograr que la interacción entre ellos fuese igual que la natural, de modo que tampoco se podrían conseguir los mismos efectos en el organismo.

Los diferentes tipos de leche que se producen en la glándula mamaria son la leche preparto o precalostro, calostro, leche de transición, leche madura y leche del pretérmino.

### **1.2.1.- Leche preparto o precalostro**

Durante el último trimestre de la gestación, la glándula mamaria acumula en el lumen de los alvéolos una sustancia llamada precalostro, formada principalmente por exudado de plasma, células, inmunoglobulinas, lactoferrina, seroalbúmina, sodio, cloro y una pequeña cantidad de lactosa (*Temboury MC, 2004*).

La existencia de esta leche demuestra que las uniones entre las células alveolares no son impermeables durante el embarazo, sino que permiten el flujo del agua y los solutos entre el espacio lácteo y el líquido intersticial en la glándula mamaria (*Lawrence RA, 2007*).

La concentración de lactosa está relacionada directamente con la de potasio, pero las concentraciones de sodio y cloruro están relacionadas inversamente con la de lactosa (**Tabla 3**).

Tabla 3.- Composición de la leche humana antes del parto

Componente de la leche	Unidad	Media $\pm$ DE	Componente de la leche	Unidad	Media $\pm$ DE
Días preparto		20,21 $\pm$ 12,18	Calcio	mg/dl	25,35 $\pm$ 8,48
Lípidos	%	2,07 $\pm$ 0,,98	Magnesio	mg/dl	5,64 $\pm$ 1,44
Lactosa	mM	79,78 $\pm$ 21,68	Citrato	mM	0,40 $\pm$ 0,17
Proteínas	g/dl	5,44 $\pm$ 1,71	Fosfato	mg/dl	2,32 $\pm$ 0,70
Glucosa	mM	0,35 $\pm$ 0,16	Calcio ionizado	mM	3,25 $\pm$ 0,84
Sodio	mM	61,26 $\pm$ 25,82	pH		6,83 $\pm$ 0,18
Potasio	mM	18,30 $\pm$ 5,67	Urea	mg/dl	14,87 $\pm$ 2,40
Cloruro	mM	62,21 $\pm$ 17,44	Creatinina	mg/dl	1,47 $\pm$ 0,35

Fuente: *Lawrence A, 2007. Tomado de Allen JC et al, 1991*

### 1.2.2.- Calostro

Durante los primeros 4 días después del parto se produce el calostro, fluido amarillento y espeso de alta densidad y escaso volumen. En estos primeros días se produce un volumen de 2 a 20 ml por toma, suficiente para satisfacer las necesidades del recién nacido (*Jensen RG, 1995*).

El color amarillento se debe a su contenido en  $\beta$ -caroteno.

El calostro tiene menos contenido energético, lactosa, lípidos, glucosa, urea, vitaminas hidrosolubles, PTH y nucleótidos que la leche madura. Sin embargo, contiene más proteínas, ácido siálico, vitaminas liposolubles E, A, K y carotenos que la leche madura. El contenido en minerales como sodio, zinc, hierro, azufre, selenio, manganeso y potasio también es superior en el calostro (*Lawrence RA, Lawrence RM, 2007*).

El contenido en calcio y fósforo varía según los diferentes autores. La proporción proteínas del suero/ caseína es de 80/20 en el calostro, mientras que en la leche madura de 60/40, e incluso 50/50 en la lactancia tardía. La concentración de los aminoácidos libres varía entre el calostro, la leche de transición y la leche madura. La cantidad de proteínas disminuye rápidamente durante el primer mes y se estabiliza un tiempo, para disminuir después muy lentamente a lo largo de la lactancia (*Temboury MC, 2004*).

La cuantificación de nitrógeno y proteínas en el calostro puede verse en la **Tabla 4**, expresados los valores en mgN/ml y en mgP/ml. En estos datos no se expresa la cantidad de caseína, que como se ha dicho es prácticamente es inexistente en este periodo (*Hambraeus L, 1977*).

**Tabla 4.- Composición en proteínas y nitrógeno del calostro**

	<b>CALOSTRO</b>
<b>Nitrógeno total</b>	<b>3,60 mg/Nml</b>
<b>Nitrógeno proteico</b>	<b>3,13 mg/Nml</b>
<b>Nitrógeno no proteico</b>	<b>0,47 mg/Nml</b>
<b>Nitrógeno ureico</b>	<b>0,05 mg/Nml</b>
<b>Caseína</b>	<b>---</b>
<b>α-lactoalbúmina</b>	<b>2,18 mgP/ml</b>
<b>Lactoferrina</b>	<b>3,30 mgP/ml</b>
<b>IgA secretora</b>	<b>3,64 mgP/ml</b>
<b>Lisozima</b>	<b>0,34 mgP/ml</b>
<b>Albúmina sérica</b>	<b>0,32 mgP/ml</b>

Fuente: *Hambraeus L y cols, 1977*

La composición de los ácidos grasos del calostro humano muestra marcadas diferencias geográficas relacionadas con la dieta materna, así en países con dietas ricas en ácidos grasos insaturados el calostro tiene niveles

mayores. El contenido en colesterol es superior en el calostro que en leche madura, al contrario que los triglicéridos (*Allen JC et al, 1991*). El porcentaje de ácidos grasos de cadena media se incrementa en la leche madura en comparación con el calostro, reflejando un aumento de la síntesis de novo, mientras que el contenido en ácidos grasos de cadena larga y de fosfolípidos es similar. También tiene diferente composición en gangliósidos que la leche madura.

El calostro tiene un contenido muy elevado en inmunoglobulinas especialmente en inmunoglobulina A secretora (IgAs), lactoferrina, células (linfocitos y macrófagos), oligosacáridos, citoquinas y otros factores defensivos, que protegen a los recién nacidos de los gérmenes ambientales y favorecen la maduración de su sistema defensivo (**Tabla 5**).

Está adaptado a las necesidades específicas del neonato por que sus riñones inmaduros no pueden manejar grandes cantidades de líquidos y además facilita la evacuación de meconio evitando la hiperbilirrubinemia neonatal (*Huang MJ et al, 2004*). Contiene enzimas intestinales que ayudan en la digestión (la lactasa y otras enzimas intestinales están inmaduras en el recién nacido). Sus abundantes inmunoglobulinas cubren el endotelio del tubo digestivo evitando la adherencia de los patógenos.

Facilita la colonización del tracto intestinal por *Lactobacillus bifidus* (*Latineen SJ, 2009*).

Contiene antioxidantes y quinonas que le protegen del daño oxidativo.

Es rico en factores de crecimiento que estimulan la maduración del aparato digestivo y de los sistemas defensivos (*Cleary TG, 2004*).

Tabla 5.- Composición del calostro y de la leche madura

COMPONENTE	Calostro	Leche madura/100ml
Energía (Kcal)	58	70-75
Agua (%)	87,2	88
Lactosa (g)	5,3	7,3
Nitrógeno total (mg)	360	171
NNP (mg)	47	42
Proteínas totales (g)	2,3	0,9
Caseína (mg)	140	187
$\alpha$ -lactoalbúmina (mg)	218	161
Lactoferrina (mg)	330	167
IgA (mg)	364	142
Grasas totales (g)	2,9	4,2
Ácido linoleico (% del total)	6,8	7,2
Ácido linolénico		1,00
C20 y 22 poliinsaturados	10,2	2,9
Colesterol (mg)	27	16
Vitamina A (mcg)	89	47
$\beta$ -caroteno (mcg)	112	23
Vitamina D (mcg)		0,004
Vitamina E (mcg)	1280	315
Vitamina K (mcg)	0,23	0,21
Tiamina (mcg)	15	16
Vitamina B6 (mcg)	12	28
Vitamina B12 (mcg)	200	26
Ácido ascórbico (mcg)	4,4	4,0
Calcio (mg)	23	28
Magnesio (mg)	3,4	3,0
Sodio (mg)	48	15
Potasio (mg)	74	58
Cloro (mg)	91	40
Fósforo (mg)	14	15
Cobre (mcg)	46	35
Yodo (mcg)	12	7
Hierro (mcg)	45	40
Zinc (mcg)	540	166

Fuente: Lawrence RA, 1999. Extraído de Temboursy MC, 2004

### 1.2.3.- Leche de transición

Es la leche que se produce entre los 7-10 días hasta las 2 semanas posparto. Entre el cuarto y sexto día se produce un aumento brusco en la producción de leche (subida de la leche), que sigue posteriormente aumentando hasta alcanzar un volumen de 600- 700 ml día entre los 15 y 30 días posparto (Dewey KG, 1997; Neville MC, 1995)

La concentración de inmunoglobulinas y de proteínas totales disminuye, mientras que aumenta la de lactosa y lípidos, con el consiguiente incremento del contenido calórico total (Lawrence RA, 2007). Las vitaminas hidrosolubles por su parte muestran un aumento, mientras las liposolubles disminuyen hasta los niveles de la leche madura.

Esta leche va variando día a día hasta alcanzar la composición de la leche madura.

### 1.2.4.- Leche madura

La leche madura tiene una gran variedad de componentes nutritivos y no nutritivos. El volumen promedio de leche madura producida por una mujer es de 700-900 ml/día durante los 6 primeros meses postparto y de 600 ml/día en el segundo semestre (Lawrence RA, 2007)

Si la madre tiene gemelos se producirá un volumen suficiente para cada uno de ellos. Cuando la lactancia involuciona pasa por una fase calostrál antes de desaparecer la secreción de leche.

### 1.2.4.1.- Macronutrientes

#### 1.2.4.1.1.- Energía

La leche humana proporciona alrededor de 64-72 kcal/dL, (*Butte NF et al, 2000*) como puede verse en la **Tabla 6**, aunque estos valores varían en función de su contenido en grasas, y en un menor grado de proteínas y carbohidratos (*Jensen, 1995*). Los niños amamantados al seno materno consumen menos calorías que aquellos alimentados con fórmulas (*Axelsson I et al, 1987*).

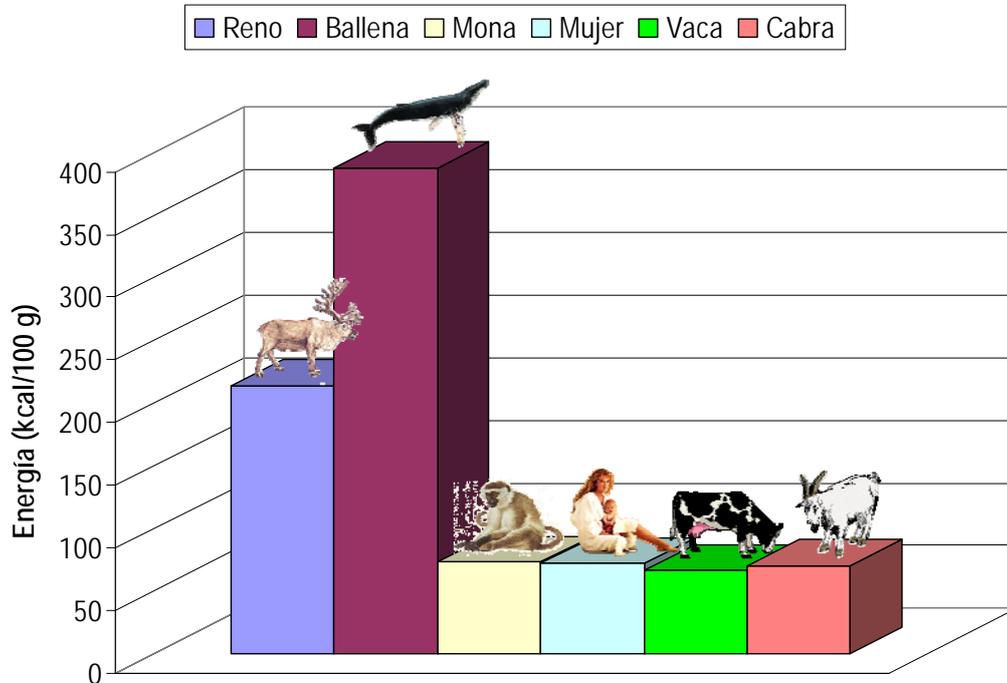
No se sabe a ciencia cierta si esta diferencia en la ingesta de energía tiene que ver con la composición de la leche materna, con la imposibilidad de conocer el volumen de la leche consumida, o con otros factores como la regulación de la saciedad.

Los niños alimentados al pecho son, además, más delgados para su peso a los 8 a 11 meses que aquellos alimentados con fórmula, pero estas diferencias van desapareciendo de los 12 a los 23 meses de edad. A los 5 años de edad las diferencias dejan de ser notables

**Tabla 6.- Valor energético de la leche humana, de vaca y fórmula de inicio, y porcentajes calóricos de los macronutrientes correspondientes**

Leches	Energía total		Macronutrientes (% de Energía total)		
	(kcal/dL)	(kJ/dL)	Grasa	Hidratos de Carbono	Proteína
<b>Humana</b>	68 (64-72)	285,6 (268,8-302,4)	57	38	5
<b>Bovina</b>	68 (64-72)	285,6 (268,8-302,4)	47	33	20
<b>Fórmula de inicio</b>	68 (64-72)	285,6 (268,8-302,4)	40-55	32-48	8-11

La **Figura 1** muestra el aporte energético de la leche humana en comparación con otras especies animales.



**Figura 1.- Porcentaje de energía de leches de distintos mamíferos**

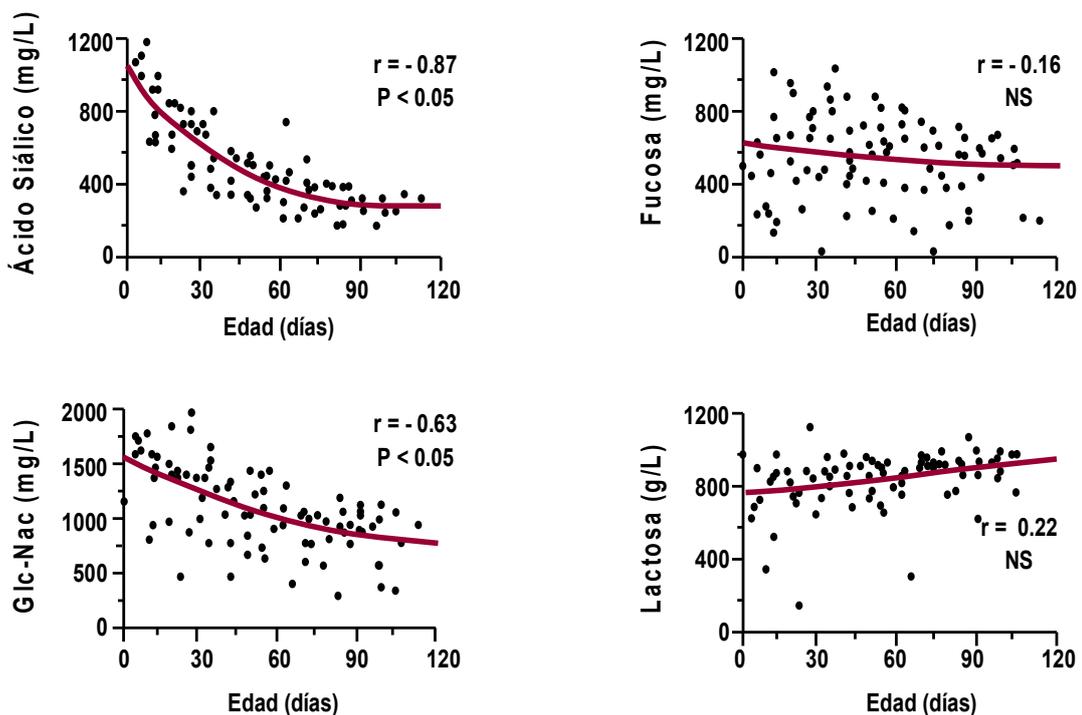
#### 1.2.4.2.- Hidratos de carbono

Representan el 38% de la energía total, como se vió anteriormente en la tabla 6.

La lactosa representa el componente mayoritario de los hidratos de carbono (90%) con cantidades promedio de 6-7 g/100 mL. Se han dado valores desde  $56,0 \pm 6,06$  g/L de lactosa en el 4º día de vida hasta valores de  $64,1 \pm 6,45$  g/L a los 30 días de lactancia (Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P y cols, 1993). La estimación es distinta si se usan procedimientos no específicos que dan valores más altos o métodos completamente específicos con promedios de  $185 \pm 14$  mmol/L (Newburg DS, Neubauer SH, 1995)

Tiene un evidente papel energético, aumenta la biodisponibilidad digestiva del calcio y del magnesio, y es la fuente única de aporte de galactosa, a la cual se le atribuyen funciones tan importantes como la de contribuir a la síntesis de diversos lípidos cerebrales (*Dagnelie PC, van Staveren WA, Roos AH et al, 1992*) como los galactolípidos, y facilitar procesos de desintoxicación hepática. Además es poco dulce, por lo que no estimula una ingesta exagerada.

Existen asimismo oligosacáridos en cantidad aproximada de 1 a 1,2 g/100 mL, lo que los hace ser el tercer constituyente de la leche materna después de lactosa y grasa, alcanzando por tanto concentraciones superiores a la propia proteína (*Warren CD, Chaturvedi P, Newburg AR y cols, 2001*). La cantidad indicada es además muy superior a la que presenta la leche de vaca, que sólo es de 0,1 g/100 mL.



**Figura 2.- Evolución de la concentración de los componentes de los oligosacáridos de la leche humana**

Glic-Nac: N-acetilglucosamina

Fuente: Mataix J, López Frías M. Lactación. En: Nutrición y Alimentación Humana. Ergon, Madrid 2009

A lo largo de la lactancia, la lactosa aumenta ligeramente, mientras que los oligosacáridos disminuyen progresivamente, aunque en valor global sigue siendo importante (**Figura 2**).

Los citados oligosacáridos están constituidos por ácido siálico, N-acetilglucosamina, L-fucosa, D-glucosa y D-galactosa fundamentalmente, atribuyéndosele diversas funciones (*Chaturvedi P et al, 2001*). Las más destacables y además las más sustentadas científicamente son dos:

a). *Efecto bacteriostático*. Los oligosacáridos inhiben la adhesión enterocitaria a los receptores intestinales, pues actúan como análogos de éstos (*Gudiel-Urbano M, Goñi I, 2001*). Este efecto se ha visto de modo especial en el caso del rotavirus.

b). *Efecto bifidógeno*. La fermentación de los oligosacáridos conduce a una disminución del pH intestinal, favoreciendo la proliferación del *bifidobacterium bifidum*, que mantiene a su vez el pH ácido al producir la fermentación de sustratos (*Kunz C, Rudloff S, Baier W, 2000*). Es por ello por lo que a los oligosacáridos de la leche humana se les considera la fibra alimentaria de la misma.

Las cifras de lactosa aumentan a lo largo de la lactancia mientras los oligosacáridos van disminuyendo progresivamente, aunque en conjunto la cifra de polisacáridos que permanecen es importante (*Newburg DS, 2000*)

En la leche humana puede hallarse asimismo glucosa, que alcanza una cifra de  $1,5 \pm 0,4$  mmol/L en la leche madura, y galactosa en una proporción de  $15 \pm 2$  mmol/L (*Asakuma S et al, 2007*)

#### 1.2.4.3.- Proteína

La leche humana contiene la menor cantidad de proteína respecto a todas las leches de hembras de mamíferos, siendo su valor de 0,9 g/dL (**Tabla**

7), contribuyendo por tanto a tan sólo el 5% de aporte energético, como se indicó en la anterior tabla 6.

Tabla 7.- Composición en **macronutrientes** y **minerales** (cenizas) de leches de distintas especies de mamíferos

Especie	Proteína	Relación caseína/proteína sérica	Grasa	Lactosa	Sólidos totales	Cenizas	Días necesarios para duplicar el peso al nacimiento
Mujer 	0,9	0,3	3,8	7,0	12,4	0,2	180
Mona 	2,1	---	3,9	5,9	---	---	---
Vaca 	3,4	4,7	3,7	4,8	12,7	0,7	47
Yegua 	2,5	---	1,9	6,2	11,2	0,5	50
Cerda 	4,8	1,4	6,8	5,5	18,8	---	10
Búfala 	3,8	4,6	7,4	4,8	---	0,8	70
Cordera 	5,5	5,1	7,4	4,8	19,3	1,0	10
Cabra 	2,9	6,3	4,5	4,1	---	0,8	19
Coneja 	13,9	---	18,3	2,1	32,8	1,8	7
Ballena azul 	10,9	2,0	42,3	1,3	57,1	1,4	10
Foca ártica 	8,9	1,1	53,3	0,1	65,4	0,5	---

Los valores se expresan en g/100 g de leche, excepto para la relación caseína/proteínas solubles

Fuente: *Mataix J, 2005. Nutrición para educadores 2ª ed.*

La cuantificación de nitrógeno y proteínas en la leche madura puede verse en la **Tabla 8**, expresados los valores en mgN/ml y en mgP/ml, y puede compararse a la del calostro, que se indicaba en la anterior tabla 4.

Tabla 8.- Composición en proteínas y nitrógeno de la leche madura

	<b>CALOSTRO</b>	<b>LECHE MADURA</b>
<b>Nitrógeno total</b>	<b>3,60 mg/Nml</b>	<b>1,71 ± 3,60 mg/Nml</b>
<b>Nitrógeno proteico</b>	<b>3,13 mg/Nml</b>	<b>1,29 ± 0,26 mg/Nml</b>
<b>Nitrógeno no proteico</b>	<b>0,47 mg/Nml</b>	<b>0,42 ± 0,10 mg/Nml</b>
<b>Nitrógeno ureico</b>	<b>0,05 mg/Nml</b>	<b>0,14 ± 0,03 mg/Nml</b>
<b>Caseína</b>	<b>---</b>	<b>1,87 ± 0,65 mgP/ml</b>
<b>α-lactoalbúmina</b>	<b>2,18 mgP/ml</b>	<b>1,61 ± 0,33 Pmg/ml</b>
<b>Lactoferrina</b>	<b>3,30 mgP/ml</b>	<b>1,67 ± 0,33 Pmg/ml</b>
<b>IgA secretora</b>	<b>3,64 mgP/ml</b>	<b>1,42 ± 0,56 Pmg/ml</b>
<b>Lisozima</b>	<b>0,34 mgP/ml</b>	<b>0,38 ± 0,04 mgP/ml</b>
<b>Albúmina sérica</b>	<b>0,32 mgP/ml</b>	<b>0,40 ± 0,09 mgP/ml</b>

Fuente: Hambraeus L y cols, 1977

En la leche madura existen por tanto dos fracciones nitrogenadas, una correspondiente al nitrógeno proteico, que forma el 75% del nitrógeno total y otra de nitrógeno no proteico, que corresponde al restante 25% (*Ronayne de Ferrer P, 1993*)

### **Nitrógeno proteico**

La primera fracción incluye dos grupos de componentes: la caseína y las proteínas del suero, séricas o solubles, así denominadas porque se encuentran en forma soluble en el suero resultante tras cuajar la caseína de la leche (*Mataix J, Lopez-Frías M, 2009*). Ambos grupos de componentes están presentes en una relación de 40:60 (*Lonnerdal B, 1995*).

Las micelas de caseína están formadas por subunidades proteicas; predomina la β-caseína y es minoritaria la α-caseína, que estaría ausente. La k-caseína precipita al cuajar o coagular con cuajo o pH ácido.

La caseína constituye entre el 10 y el 50% del total de las proteínas, y el lactosuero entre el 50 y el 90% (Lönnerdal B, Atkinson S, 1995)

Hace años se planteó que los fragmentos de caseína obtenidos de la digestión enzimática estimularían el sistema inmunológico del lactante (Migliore-Samour D, 1988). Recientemente, se le asignaron roles relacionados con la absorción de iones calcio y actividades antitrombóticas, antihipertensivas y opioides (Lönnerdal B, 2003).

Los valores de proteínas en la leche materna en distintos periodos de la época de madurez de la misma pueden observarse en la **Tabla 9**.

**Tabla 9.- Cambios en los valores de proteínas y nitrógeno de la leche materna durante los primeros meses de lactancia**

<i>g/l</i>	<i>0-15 días</i>	<i>15-45 días</i>	<i>45-105 días</i>	<i>105-195 días</i>
Verdadera proteína	15,8 ± 4,2	9,2 ± 1,8	7,05 ± 1,6	6,9 ± 1,2
α-lactoalbúmina	3,62 ± 0,59	3,26 ± 0,47	2,78 ± 0,49	2,68 ± 0,59
Lactoferrina	3,53 ± 0,54	1,94 ± 0,38	1,65 ± 0,29	1,39 ± 0,26
Albúmina sérica	0,39 ± 0,06	0,41 ± 0,07	0,39 ± 0,04	0,38 ± 0,04
IgA secretora	2,0 ± 2,5	1,0 ± 0,3		0,5 ± 0,01
IgM	0,12 ± 0,03	0,2		0,2
IgG	0,34 ± 0,01	0,05 ± 0,03	---	0,03
Nitrógeno total	3,05 ± 0,59	1,93 ± 0,24	1,61 ± 0,21	1,48 ± 0,17
Nitrógeno no proteico	0,53 ± 0,09	0,46 ± 0,03	0,41 ± 0,04	0,38 ± 0,07

Fuente: Sanchez-Pozo et al, 2001

Algunos de los valores hallados por *Sánchez-Pozo y cols* en España se detallan en la siguiente **Tabla 10**.

Tabla 10.- Valores de algunas proteínas y porcentajes de algunas fracciones proteicas de la leche materna en distintos periodos de lactancia

Periodo	Proteínas (g/dl)	Lactoferrina (%)	$\beta$ -caseína (%)	$\kappa$ -caseína (%)	$\alpha$ -lactoalbúmina (%)	Lisozima (%)
0-5 días	1,75 $\pm$ 0,12	32,6 $\pm$ 2,7	12,9 $\pm$ 2,4	10,2 $\pm$ 1,1	23,2 $\pm$ 2,1	1,5 $\pm$ 0,6
6-15 días	1,41 $\pm$ 0,04	25,6 $\pm$ 0,9	13,8 $\pm$ 1,8	9,5 $\pm$ 0,9	24,5 $\pm$ 2,2	6,6 $\pm$ 1,9
16-30 días	1,33 $\pm$ 0,05	17,4 $\pm$ 1,9	15,8 $\pm$ 2,5	9,2 $\pm$ 1,2	35,9 $\pm$ 3,4	7,1 $\pm$ 1,8
31-60 días	1,10 $\pm$ 0,02	17,8 $\pm$ 1,5	13,1 $\pm$ 1,5	9,1 $\pm$ 0,7	30,5 $\pm$ 2,7	8,4 $\pm$ 1,7
> 60 días	1,03 $\pm$ 0,06	18,9 $\pm$ 1,6	15,6 $\pm$ 2,1	13,1 $\pm$ 1,6	28,1 $\pm$ 2,1	12,1 $\pm$ 1,8

Fuente: Sanchez-Pozo et al

Como se ha dicho, en la leche humana predominan las proteínas solubles, mientras que la caseína es la forma predominante en la vaca. Por otra parte, tal como se indica en la **Tabla 11**, el nitrógeno no proteico, del que luego se hablará, es muy elevado en la leche de mujer y muy pobre, porcentualmente hablando, en la leche de vaca (20 y 5% respectivamente).

Tabla 11.- **Contenido proteico total, tipo de proteína y nitrógeno no proteico** de leches humana y de vaca (valores aproximados expresados en porcentaje del total de nitrógeno)

Leche	Proteína total (g/dL)	Caseína	Proteínas séricas	Nitrógeno no proteico
Humana	0,9	20-28 <sup>a</sup>	50-60	20
Bovina	3,4	75-80	15-20	5

<sup>a</sup> La distribución entre las formas  $\beta$  y  $\kappa$ , oscilan entre 12-15% y 9-12% respectivamente

Fuente: Mataix J, 2005

Las diferencias no sólo están en las cantidades de proteínas, sino en el distinto tipo de las mismas que afectan tanto a la caseína como a las proteínas séricas, tal como se muestra en la **Tabla 12** para estas últimas.

Respecto a estas últimas, en la leche humana la más importante es la  $\alpha$ -lactoalbúmina, con una secuencia de aminoácidos que responde adecuadamente a los requerimientos del lactante (Hanning RM, 1992). Presenta una apropiada concentración de cistina y triptófano, limitantes en fórmulas a base de leche bovina (Heine WE et al, 1991). Como forma parte de la enzima lactosa-sintetasa, interviene en la síntesis de lactosa, aunque no existe una relación directa con su contenido.

La siguen la lactoferrina y la inmunoglobulina A secretora (IgAs), mientras que en leche de vaca predomina netamente la  $\beta$ -lactoglobulina.

**Tabla 12.- Composición de las proteínas séricas de la leche humana y de vaca (mg proteína/mL)**

Proteína	Leche humana	Leche bovina
$\alpha$ -Lactoalbúmina	2,0	0,9
$\beta$ -Lactoglobulina	---	3,0
Lactoferrina	1,7	0,012
Lisozima	0,4	0,0001
Seroalbúmina	0,5	0,3
<b>Inmunoglobulina</b>		
Ig A	1,4	0,03
Ig G	0,01	0,6
Ig M	0,01	0,03

Fuente: Mataix J, 2005

En cuanto a las posibles funciones de estas proteínas séricas se pueden destacar las siguientes:

**a)  $\alpha$ -lactoalbúmina.** Los altos niveles de esta proteína en la leche humana parecen relacionarse con la gran cantidad de lactosa que se sintetiza en glándula mamaria, ya que aquella proteína es una de las dos subunidades de la lactosa sintetasa mamaria. En cuanto a su posible función, puede ser un transportador pasivo de elementos traza, ácidos grasos y calcio (*Lien EL, 2003*)

**b) Lactoferrina.** Al tener la capacidad de ligar dos átomos de hierro, parece tener como misión principal “secuestrar” dicho hierro e impedir su utilización por la microbiota enterobacteriana, evitando así una peligrosa proliferación microbiana (*Xanthou M, 1998*). Además, un péptido bactericida que se genera durante la digestión de la lactoferrina, la lactoferricina, sería aun más efectivo que la lactoferrina intacta (*Hamosh M, 1998*). A través de estos mecanismos, la lactoferrina puede desempeñar un papel esencial en la protección del recién nacido ante infecciones gastrointestinales. Se ha postulado que la lactoferrina promovería también la absorción del hierro, si bien no hay consenso al respecto (*Lonnerdal B, 2003*). La lactoferrina se encuentra en cantidades muy elevadas en el calostro, pero aunque desciende posteriormente, su presencia se mantiene a lo largo de toda la lactancia. En la leche de vaca la cantidad es diez veces inferior a la existente en la leche humana.

**c) Inmunoglobulinas.** Aunque es el calostro el más rico en inmunoglobulinas, también la leche madura cuenta con una cantidad importante. La principal es la IgA secretora (IgAs), con menores cantidades de IgA monomérica, IgG e IgM. Se sintetizan en la glándula mamaria y su función es la de formar anticuerpos capaces de unirse a virus y bacterias, impidiendo la penetración en la mucosa intestinal, lo que se logra gracias a su resistencia a la proteólisis y su estabilidad a pH bajo (*Lilius EM, Marnila P, 2001*). Otra función muy importante de la IgAs es el bloqueo de la adhesión de patógenos al epitelio intestinal y la unión a sus toxinas. La leche materna presenta en su

composición anticuerpos específicos contra antígenos ambientales (Garza C et al, 1998) a los que el neonato está potencialmente expuesto.

La albúmina sérica o seroalbúmina, sólo cumple el rol de aporte de aminoácidos (Lonnerdal B, 1985).

En el grupo de enzimas lácteas, la lisozima (escasa en la leche de vaca) es la más abundante y se encuentra en niveles muy superiores a los plasmáticos (Lonnerdal B, 2003). Presenta una acción bactericida en el intestino del lactante y cataliza la ruptura de las uniones  $\beta$ -1,4 de la pared celular de las bacterias.

Otra enzima importante es la lipasa, que permanece activa en el tracto gastrointestinal y es estimulada por bajas concentraciones de sales biliares, con producción de glicerol y ácidos grasos libres. Esta hidrólisis sería la causante de la alta absorción de grasas en los bebés alimentados a pecho (Lonnerdal B, 2003). Por otra parte, la liberación de ácidos grasos libres y monoglicéridos, protege contra protozoos, bacterias y virus, debido a que poseen actividad antimicrobiana.

Como otra característica importante, se le atribuye a la lipasa el efecto de inactivación del parásito *Giardia lamblia* (Gillin FD et al, 1994), muy frecuente en poblaciones de escasos recursos. También es de interés mencionar a la PAF-AH (acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas) a la que se atribuye la menor incidencia de enterocolitis necrotizante, en particular en los neonatos prematuros alimentados con leche humana.

Las mucinas, proteínas que forman parte de la membrana de los glóbulos grasos, interfieren en la adhesión de bacterias patógenas a células epiteliales, en forma similar a otras glicoproteínas y oligosacáridos; también actúan como factores de defensa inespecíficos. Algunos de los componentes mencionados presentan, además, actividad antiinflamatoria (Hamosh M, 1998; Peterson JA, 1998).

Otras proteínas presentes en la leche humana son los llamados “ligandos para ácido fólico y vitamina B<sub>12</sub>”, que no los contiene la leche de vaca. Debido a que estos nutrientes son esenciales para el desarrollo de muchos microorganismos, juegan un papel bacteriostático comparable a la lactoferrina.

### **Nitrógeno no proteico**

Tal como se indicó en la tabla 11, la cantidad de nitrógeno no proteico es importante en términos porcentuales en la leche materna, concretamente, corresponde al 25% del nitrógeno total (*Ronayne de Ferrer P, 1993*), estando constituida esta fracción por urea, ácido úrico, creatina, creatinina, glucoproteínas, poliaminas, espermina, espermidina y putrescina, nucleótidos, pequeños péptidos y aminoácidos libres. Asimismo merecen destacarse taurina y carnitina.

La función fisiológica de muchos de los compuestos indicados no está definida y en otros existen propuestas hipotéticas, destacando las siguientes:

a). *Aminoácidos*. Entre ellos algunos poseen funciones específicas y así el glutamato y la alanina, que abundan en la leche humana, son un buen sustrato gluconeogénico, y la glutamina es un sustrato ideal para el enterocito. Ambas funciones son claves para un adecuado fisiologismo neonatal.

b). *Taurina*. Destaca también este aminoácido especial que como aminoácido libre abunda más en la leche humana que en la de vaca (30 a 40 veces superior), lo que coincide con una menor síntesis endógena en el lactante humano, o al menos en una proporción porcentual significativa, que habla de que este aminoácido tiene en la primera época de la vida un cierto carácter esencial (*Gauli GE, 1999*). Su déficit se ha relacionado con retraso en el crecimiento, anomalía retiniana, y auditiva, asimismo en la conjugación de ácidos biliares y en la regulación del sistema nervioso. Esta intervención de la taurina en la conjugación de ácidos biliares, contribuye al predominio de las

formas conjugadas de taurocolato y tauroquenodesoxicolato en el lactante, frente a las de glicocolato y glicoquenodesoxicolato presentes mayoritariamente en el niño mayor y en el adulto, presente en el sistema nervioso central. Su deficiencia en etapas tempranas puede afectar la función retiniana (Gauli GE, 1999).

c) *Nucleótidos*. Otro componente que recientemente ha cobrado importancia son los nucleótidos libres, que constituyen del 2 al 5% del nitrógeno no proteico en la leche de mujer (Uauy R, 1994). El patrón de nucleótidos de la leche materna humana es muy distinto del correspondiente al de la leche de vaca y varía en el curso de la lactancia. Tampoco su papel está claramente dilucidado, aunque parece afectar al mantenimiento de la microbiota bífida característica del lactante y la activación de desaturasas hepáticas responsables de la formación de ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena (Kunz C et al, 1999), que tienen un cierto grado de esencialidad en el lactante. Asimismo, se han relacionado con efectos sobre la inmunidad celular y humoral e igualmente se han descrito efectos sobre el crecimiento y la diferenciación del tracto gastrointestinal y de su contenido en ADN.

d). *Carnitina*. Merece también destacarse la carnitina, fundamental para el transporte de ácidos grasos de larga cadena a través de la membrana mitocondrial, y que puedan sufrir la  $\beta$ -oxidación correspondiente. La falta de carnitina en un neonato puede conducir a problemas en esa vía catabólica y por tanto en la obtención de energía (Kunz C et al, 1999). Asimismo se pueden generar problemas en el metabolismo de compuestos acetil-CoA, cetogénesis y en el balance nitrogenado.

Dadas esas peculiaridades fisiológicas se recomienda que las leches infantiles contengan taurina y carnitina (Crill CM, 2007). Posiblemente también en un futuro se haga la misma recomendación con los nucleótidos, aunque de momento no todas las fórmulas infantiles los contienen.

Alguno de estos componentes, como taurina y nucleótidos, dadas sus posibles repercusiones fisiológicas se están adicionando en las leches

adaptadas (Ferreira IM, 2003). Otros, por diferentes causas, no se están añadiendo, y entre estos compuestos tenemos lactoferrina, inmunoglobulinas y otros componentes de defensa inmunitaria (Rivero M et al, 2005).

#### 1.2.4.4.- Grasas

El componente graso de la leche humana es de 4-4,5 g/dL (Argüelles F, 2008). Las grasas representan una importante fuente de energía para el bebé y aportan aproximadamente el 50% de las calorías totales. Son fuente de ácidos grasos esenciales y vehículo de las vitaminas liposolubles, cuya absorción favorecen. Realizan un aporte balanceado de ácidos grasos  $\omega_6$  y  $\omega_3$ , importante para lograr una síntesis equilibrada de eicosanoides (Jensen R, 1995). Además, la grasa es un componente fundamental de las membranas celulares: según el tipo de grasa que la forme, tendrá mayor o menor viscosidad, elasticidad, flidez, permeabilidad, y capacidad de respuesta a estímulos (Argüelles F, 2008)

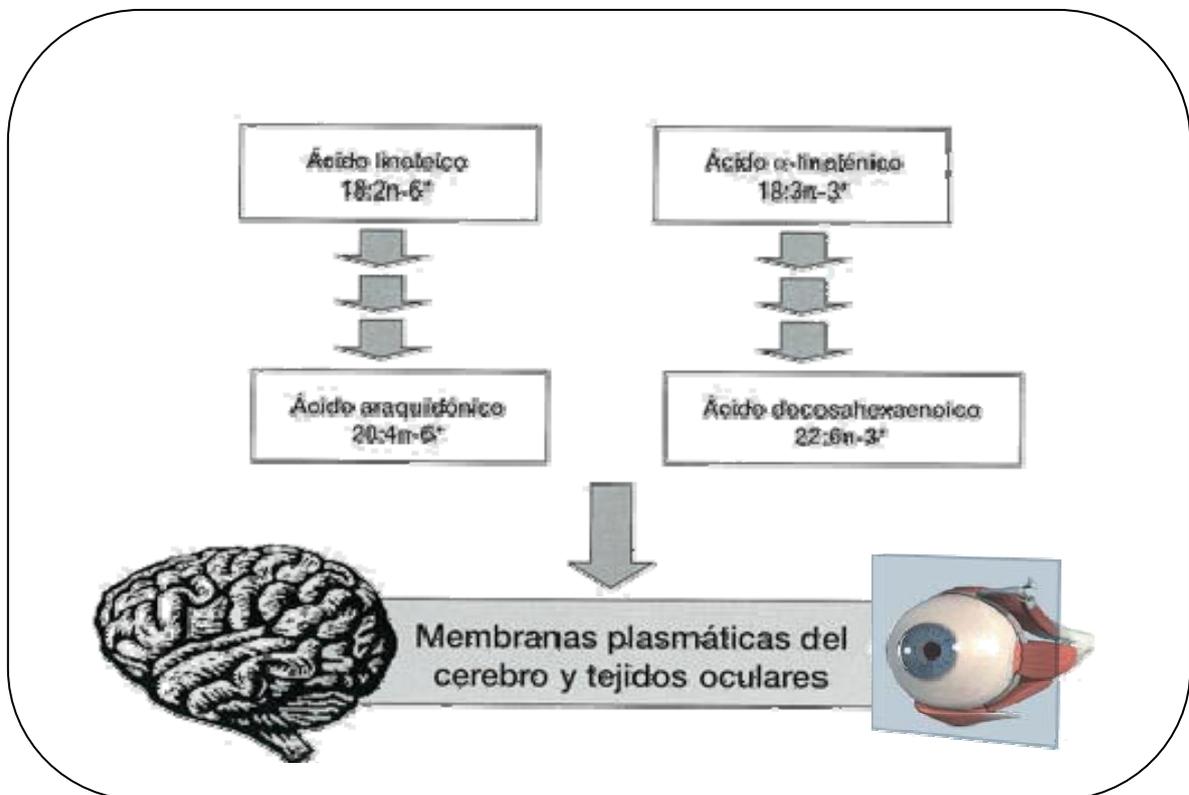
Los lípidos están compuestos en un 98% por triglicéridos. El ácido oleico (18:1,  $\omega_9$ , 32,8%) y el palmítico (16:0, 22,6%) son los ácidos grasos más abundantes que los componen (Mataix J, 2009). El tercero en abundancia es uno de los ácidos grasos esenciales, el ácido linoleico (18:2,  $\omega_6$ , 13,6%).

Los ácidos grasos saturados representan el 42 a 47% y los insaturados, el 53 a 58% (Prentice A, 1996). Los poliinsaturados de cadena larga, que no se encuentran en la leche de vaca, son beneficiosos en la etapa de crecimiento y maduración del sistema nervioso central del bebé (Schanler RJ, 1989; Rodríguez-Palmero M et al, 1999). A este respecto, en los últimos años se ha destacado el rol de los ácidos araquidónico y docosahexaenoico, que son los que predominan en cerebro y retina del neonato (Figura 3), en el desarrollo neurológico y de funciones visuales (Ronayne de Ferrer PA, 2000).

El ácido oleico (18:1,  $\omega_9$ ), mayoritario en la leche humana, no es un ácido graso esencial. Sin embargo, se observa su acumulación en el tejido

nervioso en la etapa neonatal, en particular en la mielina. Es precursor de otros ácidos grasos monoenoicos, característicos de los esfingolípidos de la mielina.

El colesterol también está presente de forma considerable, siendo este necesario para la síntesis de ácidos biliares, hormonas esteroideas, y para el desarrollo de los mecanismos reguladores de su catabolismo. El lactante tiene una capacidad limitada para sintetizarlo (*Argüelles F, 2008*). También se piensa que esta cantidad de colesterol presente en la leche cumple un papel importante en la maduración de los mecanismos de control de la colesterolemia en la edad adulta (*Argüelles Martín F, 2007*).



**Figura 3. Papel del ácido araquidónico (AA) y del ácido docosahexaenoico (DHA)**

La cantidad de grasa en la leche varía ampliamente a lo largo del día y también según la dieta de la madre, la fase de la toma y la duración de la lactancia.

La cantidad total de grasas de la leche humana es muy similar a la contenida en la leche de vaca, aunque tiene características muy diferentes,. Dichas características se pueden observar en la **Tabla 13**.

**Tabla 13.** Características de los lípidos de la leche humana.

- **Vehículo de ácidos grasos esenciales**
- **Contenido muy variable**
- **Fundamentalmente triglicéridos**
- **Pocos ácidos grasos de casena corta**
- **Abundantes PUFA**
- **Palmítico en posición 2**
- **Alto contenido en colesterol**
- **Contenido total 4-4,5 g/100 mL**

### **Función de los PUFA durante la lactancia y gestación.**

Los ácidos grasos esenciales y sus derivados poliinsaturados de larga cadena desempeñan un papel crucial en el desarrollo fetal y en el periodo de gestación (*Dutta-Roy AK, 1997; Kurlak y Stephenson, 1999; Uauy et al, 2000; Smith, 2002*). Durante la gestación, es necesario adquirir ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga para el desarrollo de la placenta y del feto. Además, existen pruebas evidentes de que la nutrición y la salud maternas durante el período de la concepción tienen una importancia crucial sobre el desarrollo del feto (*Connor et al, 2000; Gibson y Makrides, 2001*), de forma que al nacimiento existe una relación significativa entre el *estatus* de LCPUFA de la madre y el recién nacido (*Connor et al, 1996; Veizing-Aarts et al, 2001*).

Los acontecimientos que preceden a la concepción influyen en el proceso fisiológico de acumulación de grasa y en la naturaleza de la grasa almacenada. Ésta es la grasa que se tiene a disposición durante el periodo de

la formación y la división celular en el desarrollo embrionario y de la placenta durante el primer trimestre de gestación (FAO, 1993).

A partir del momento de la concepción también se acumulan cantidades importantes de grasa para mantener el crecimiento fetal, reservas que son utilizadas fundamentalmente durante el tercer trimestre de la gestación (Kurlak y Stephenson, 1999; Montgomery y col, 2003), así como para satisfacer las necesidades iniciales de la lactancia (Gibson y Makrides, 2001). Las carencias específicas de ácidos grasos  $\omega$ -3 durante la gestación y el primer año de vida influyen en la integridad neurológica (Budowski y col., 1987; Crawford y col., 1989; Uauy, 2000; Wainwright, 2002) y afectan selectivamente al aprendizaje y a la capacidad visual (Wheeler y col., 1975; Lamptey y Walker, 1976; Yamamoto y col., 1987; Bourre y col., 1989; Carrié y col., 2000). Los estudios realizados con primates no humanos confirman que la carencia de  $\omega$ -3 disminuye el desarrollo de la función retinal y de la agudeza visual (Neuringer y Col., 1988).

Estudios recientes en niños, han concluido que los ácidos grasos  $\omega$ -3 son esenciales y que es necesario incluir DHA en las leches para lactantes (Birch y Col., 1992a y 1993; Carlson y col., 1993a; Uauy y col., 1990; Uauy, 1992). Aunque no existen estudios similares con AA, los datos experimentales sugieren que los niveles bajos de AA se asocian a un crecimiento prenatal lento (Crawford y col., 1989; Leaf y col., 1992) y postnatal tardío en los niños prematuros (Carlson et al., 1996). Por tanto, el ácido araquidónico debe considerarse un nutriente esencial durante las primeras etapas del desarrollo debido a que se encuentra en la leche humana (Koletzko y col. 1992) junto con el ácido docosahexaenoico. Así, la Sociedad Europea de Pediatría, Gastroenterología y Nutrición en 1991, la Fundación Británica de Nutrición en 1992 y el comité de expertos sobre Grasas y Aceites en Nutrición Humana de la WHO/FAO en 1997 han recomendado añadir a las fórmulas lácteas para niños prematuros LNA, DHA y AA. En 1994, la Sociedad Internacional de Ácidos Grasos y Lipidos ya coincidió en dichas recomendaciones.

Como se ha indicado anteriormente, la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena para el feto y el neonato esta ampliamente contrastada y cada vez se hace más evidente el papel que desempeñan en la regulación de la función celular. Algunos de los estudios que intentan aclarar la función de los PUFA durante la etapa prenatal y postnatal temprana son los siguientes:

- La disponibilidad del ácido araquidónico como precursor de eicosanoides, leucotrienos, prostaglandinas y tromboxanos (*Barber y Ponz, 1998; Kurlak y Stephenson, 1999*).
- El papel del ácido araquidónico como segundo mensajero (*Kurlak y Stephenson, 1999; Wainwright, 2002*).
- El rol estructural del DHA y AA como componentes de los fosfolípidos en las membranas celulares, con especial énfasis en el DHA como principal componente de las membranas de las células neuronales y de la retina (*Bourre y col., 1989; Treen y col, 1992; Uauy y col., 2000; Carrié y col., 2000*).
- La insaturación de la cadena de carbono puede afectar a la fluidez de la membrana celular. La fluidez de la membrana modula la función de receptores y transportadores, al mismo tiempo que interacciona con factores de transcripción en el interior de la célula (*Clanidin, 1994; Wainwright, 2002*). Los más conocidos son los "receptores activados por proliferadores peroxisomales" (PPAR) que son sensibles a la presencia de ácidos grasos libres en el citoplasma. Los PPAR parece que controlan la expresión de la acil-CoA sintasa y de proteínas relacionadas con la unión y el transporte de los ácidos grasos (*Kurlak y Stephenson, 1999; Garcia Muriana A, 2002; Uauy y col., 2000*).

### **Período prenatal**

Durante la gestación, la madre adapta su metabolismo a las necesidades de feto. En este periodo, la concentración de fosfolípidos plasmáticos aumenta en más de un 50%, como consecuencia de la

hiperlipidimia asociada a este estado. Además, las cantidades absolutas de AA y DHA se incrementan en un 23% y un 52%, respectivamente (Gil A, 2002). Este aumento de DHA, parece deberse a la movilización de depósitos maternos, más que a un aumento de la síntesis o cambios en los hábitos dietéticos. Además, bajas concentraciones en plasma de AA y DHA están relacionadas con un peso inferior de la placenta, y éste hecho también se ha relacionado con una gestación más corta y menores perímetros cefálicos en los recién nacidos (Gil A, 2002).

Durante los primeros dos tercios de la gestación, la mayor parte del incremento de peso de la madre corresponde a la acumulación de depósitos de grasa, depósitos que serán liberados en el último tercio de la misma (Boza, 1998; Uauy y col., 2000; Herrera, 2002). En este último tercio de la gestación, la actividad lipolítica del tejido adiposo es potenciada, y sus productos, ácidos grasos libres y glicerol, son fundamentalmente dirigidos al hígado materno, donde los FFA (ácidos grasos libres) son convertidos en cuerpos cetónicos y el glicerol en glucosa, ambos productos atraviesan fácilmente la placenta para participar en el metabolismo fetal (Dutta-Roy, 1997; Herrera, 2002).

Durante el último trimestre de gestación, el feto capta 50-60 mg/d de LCPUFA n-3, aproximadamente un 4-5% de la energía requerida. Para que exista un equilibrio adecuado, la madre gestante debería ingerir alrededor de 100 mg/d de estos ácidos grasos (Gil A, 2002; Uauy A y col., 2000). Una ingesta materna excesiva de LCPUFA  $\omega$ -3 puede tener efectos inhibitorios sobre las A<sub>5</sub> y A<sub>6</sub> desaturasas, hecho que puede causar un descenso del nivel de AA, de la misma manera que una elevada concentración de LCPUFA  $\omega$ -6 en el plasma materno hace que disminuya la concentración de LCPUFA  $\omega$ -3 (Cho y col., 1999; Uauy y col., 2000; Herrera, 2002). La proporción entre los ácidos grasos  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3 presentes en la dieta debe mantener un rango entre 5:1 y 10:1, y la proporción entre el DHA y el AA debe ser de 1:1 a 1:2, para que no exista competencia por las desaturasas (Uauy y col., 2000). Así, la suplementación de la dieta de mujeres gestantes con 2.7 g/d de aceite de pescado desde la semana treinta de la gestación hasta el parto, se traduce en un aumento significativo de los ácidos grasos  $\omega$ -3 en los fosfolípidos del cordón

umbilical y en una disminución concomitante de los ácidos grasos  $\omega$ -6 (Gil A, 2002).

### **Período postnatal**

Los recién nacidos alimentados con la leche materna tienen niveles más elevados del DHA y AA, en comparación con los alimentados con la mayoría de las fórmulas lactorreemplazantes comercializadas (Sanders y Naismith, 1979; Makrides y Col, 1996; Innis y col., 1996; Maurage y Col., 1998). En bebés recién nacidos, la cantidad de ácidos grasos liberados en plasma aumenta seis veces durante las cinco primeras horas de vida (Leskanich y Noble, 1999).

Durante la lactación la madre pierde 70-80 mg/día de DHA en la leche, además de las cantidades utilizadas para satisfacer las demandas endógenas. Entre los primeros días y la 5ª semana se observa un descenso del 30% de los niveles de DHA de los fosfolípidos plasmáticos. Este descenso se mantiene durante las primeras doce semanas e incluso hasta los 6 meses (Gil A, 2002).

La leche humana contiene una cantidad variable de AA y DHA preformados que oscila de 0,4-0,7% para el AA y de 0,2-0,4% para el DHA, sobre el total de los AG. Su contenido es muy constante en diversas poblaciones de diferente origen étnico y con hábitos alimentarios muy diferentes. La elevada concentración de LCPUFA en el calostro de madres de niños pretérmino sugiere que las células mamarias son capaces de elongar y desaturar LA y LNA después del parto, siendo independiente de la duración del embarazo (Greiner y col., 1997).

La cantidad de DHA es mayor en la leche de las madres con un consumo alto de pescado y en aquellas mujeres que reciben una suplementación con aceite de pescado en la dieta. Sin embargo, a pesar de la concentración elevada de EPA en el aceite de pescado, el ácido graso mayoritario de la serie  $\omega$ -3 en la leche es el DHA, sugiriendo que existe un mecanismo regulador para suministrar una cantidad relativamente constante de este AG al recién nacido. Además se ha podido comprobar que el DHA de la

leche y de los eritrocitos de los recién nacidos alimentados al pecho está positivamente correlacionado con el DHA de la dieta materna (Gil A, 2002).

### Desarrollo del cerebro

Los lípidos constituyen entre un 50-60% del peso seco del cerebro de un adulto, y aproximadamente un 35% están en forma de LCPUFA, principalmente como AA y DHA (Crawford, 1993). La vida intrauterina constituye un periodo vulnerable en el desarrollo del cerebro, puesto que el feto depende totalmente del suministro materno de nutrientes específicos para su crecimiento (Dutta-Roy, 1997). El AA y el DHA se obtienen por biosíntesis a partir de sus respectivos ácidos grasos esenciales obtenidos de la dieta (LNA y LA), o bien, directamente de la dieta (Wainwright, 2002). Algunos autores han demostrado recientemente que el DHA no se obtiene a partir de sus precursores, sino que debe ser forzosamente aportado como tal en la dieta, por estar el último paso mediado por una  $\beta$ -oxidación fuera de la mitocondria, concretamente en los peroxisomas. La cantidad de PUFA se incrementa conforme avanza la gestación, aumentando de forma exponencial durante el desarrollo prenatal y, tan solo de forma lineal durante el postnatal. La mayor parte de estos, son derivados de larga cadena de las series  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6, siendo la cantidad de ácidos grasos  $\omega$ -6 dos veces superior que la de  $\omega$ -3 (Clandinin y col., 1980a; Martinez, 1995). El cerebro fetal obtiene aproximadamente 21g de DHA por semana durante el último trimestre de la gestación (Clandinin y col, 1981).

En el cerebro, la incorporación de AA y DHA en las membranas se produce mayoritariamente a partir de la reutilización de PUFA preformados, siendo esta diez veces mayor que la síntesis a partir de sus precursores. Además, en estudios con ratas se ha demostrado que únicamente el 15% del AA y del DHA son oxidados en las primeras 24 horas, mientras que sus precursores sufren un 60% de oxidación. Por otra parte, el LNA, que puede traspasar la barrera hematoencefálica, es usado para la síntesis de colesterol más que para la síntesis del DHA (Gil y col., 2002). La importancia del LNA y LA no sólo radica en su función precursora de LCPUFA, quizás sea igual de

importante el hecho de ser precursores de los cuerpos cetónicos necesarios para la síntesis lipídica cerebral *in situ* (Cunnane y col., 1999a).

La importancia relativa del mecanismo de captación de LCPUFA del plasma y el de síntesis *in situ* a partir de sus precursores, es un problema fundamental que necesita ser resuelto para establecer los requerimientos de LCPUFA de las series  $\omega$ -6 y  $\omega$ -3 del sistema nervioso central en desarrollo. Varios estudios han mostrado que el cerebro maduro y en desarrollo puede desaturar y elongar ácidos grasos esenciales en animales en experimentación (Clanidin y Col., 1980; Uauy y col., 2000). Las células endoteliales del sistema vascular del cerebro también pueden desaturar y elongar LA y LNA hasta AA y EPA, pero no completan la síntesis hasta DHA. Por otro lado los astrocitos pueden sintetizar AA y DHA, que tras ser liberados, pueden incorporarse a las neuronas del cerebro y del cerebelo (Gil A, 2002). Además, no hay una relación lineal entre la cantidad de DHA del cerebro y la de los fosfolípidos de los eritrocitos (Wainwright, 2002).

La deficiencia de ácidos grasos  $\omega$ -3 y  $\omega$ -6 en la dieta conlleva anomalías físicas y funcionales en el cerebro, puesto que en el cerebro en crecimiento cada hora se originan miles de nuevas sinapsis. Además, ambas series de ácidos grasos tienen que estar balanceadas, de manera que altos niveles del DHA con bajos niveles de ácidos grasos  $\omega$ -6 también producen un retardo en el crecimiento cerebral (Ward y col., 1998). A pesar de la abundancia del DHA en las membranas sinápticas, el AA es preferentemente liberado de los fosfolípidos de membrana por la fosfolipasa A<sub>2</sub>. Esto ocurre porque el AA es más importante como ácido graso libre, con un papel destacado en la transducción de señales de las células neuroendocrinas, estando implicado en la liberación de la hormona del crecimiento y la prolactina (Kurlac y Stephenson, 1999; Roudbaraki y col., 1996). Cuando sólo hay deficiencia de ácidos grasos  $\omega$ -3 no afecta al crecimiento del cerebro, no obstante, éste sufre cambios característicos en la composición en ácidos grasos, disminuyendo la cantidad del DHA y aumentando la del ácido docosapentaenoico (Wainwright, 2002).

También hay evidencias de que existe relación entre el contenido en ácidos grasos esenciales de la dieta y el sistema neurotransmisor del cerebro de la rata. Cuando hay una deficiencia crónica en la dieta de LNA se producen anomalías severas en la función cerebral. En el sistema mesocortical parece existir una disminución en la liberación de dopamina, y una reducción de los receptores de dopamina D2. Por el contrario en el sistema mesolímbico se incrementa la liberación basal de dopamina y los receptores D2 (*Chalón y col., 2001; Zimmer y col., 2000*).

#### **1.2.4.2.- Micronutrientes**

##### **1.2.4.2.1.- Vitaminas**

La leche de una madre bien nutrida presenta cantidades suficientes de vitaminas para el normal crecimiento del bebé (*Lonnerdal B, 2003*) sólo con la excepción de algunas.

La vitamina K se encuentra en muy bajas cantidades y no dependería de una suplementación materna. Por estar relacionada con el proceso de coagulación sanguínea, como prevención de déficit por diferentes causas se recomienda su suministro en el momento del nacimiento para evitar hemorragias hasta la estabilización de la flora intestinal (*Lonnerdal B, 1997*).

La vitamina D se considera una parahormona, con funciones hematopoyéticas y propiedades inmunoregulatoras. Cumple un rol importante en la mineralización ósea al incrementar la absorción intestinal de calcio y fósforo y la reabsorción renal de calcio. Cuando por razones climáticas, geográficas o culturales no se recibe la influencia de los rayos solares, se hace necesario su aporte diario (*Portela MLPM de, 2003*). La leche humana es deficitaria en vitamina D cuando no se reciben dichos rayos solares. Ello justifica la necesidad de suplementar con esta vitamina la dieta del niño amamantado (*Argüelles F, 2008*).

Como se mencionó previamente, la grasa de la leche actúa como vehículo de las vitaminas liposolubles.

Además de las mencionadas, se encuentran en la leche madura otras vitaminas de carácter antioxidante, tales como el  $\alpha$ -tocoferol, el retinol y el ácido ascórbico, que son provistos al feto por la madre durante el período de gestación

El tocoferol o vitamina E se encuentra en mayor concentración en la leche materna que en la de vaca (*Portela MLPM de, 2003*). Esto resulta ventajoso en función de su capacidad antioxidante, si se tiene en cuenta la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de la leche humana.

Con el término vitamina E se engloba a todos los tocoferoles y tocotrienoles con la actividad biológica del tocoferol. Se conocen el  $\alpha$ , el  $\beta$ , el  $\gamma$  y el  $\delta$  tocoferol, cuyas actividades relativas a la del  $\alpha$ -tocoferol son:  $\beta$  40%,  $\gamma$  10% y  $\delta$  1%. El  $\alpha$ -tocoferol ya sea libre o esterificado es la forma más abundante en los alimentos de origen animal, mientras que en los vegetales están presentes cantidades variables de los cuatro isómeros (*Gross SJ, Gabriel E, 1985*).

La absorción de vitamina E exige un normal proceso de absorción de los lípidos, ya que se solubiliza en la fracción miscelar. La eficiencia intestinal de la absorción del  $\alpha$ -tocoferol es sólo del 20-30%. En cambio, el  $\gamma$ -tocoferol se absorbe hasta en un 85%. La transferencia por placenta es baja, por lo que al nacimiento los valores son bajos, en cambio, es alto el pasaje de vitamina E por la leche materna (*Hayes K, Pronczuk A, Perlman D, 2001*). En la leche de vaca es muy bajo el contenido de vitamina E. Los tejidos del adulto contienen cantidades constantes de vitamina E salvo el tejido adiposo que la acumula progresivamente en relación a la ingesta.

La vitamina E ejerce dos funciones bien diferenciadas: una función antitóxica y otra a nivel enzimático que no se va a considerar.

En cuanto a la función antitóxica, la vitamina E ejerce una función de protección frente a varios agentes químicos, en especial previene de la formación de peróxidos a partir de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), con lo cual facilita el mantenimiento de la estabilidad de las membranas biológicas (Hayes K, Pronczuk A, Perlman D, 2001). Los AGPI, por su elevado contenido en dobles enlaces, son fácilmente oxidables en el organismo. De ésta oxidación se originan peróxidos, que son capaces de lesionar y destruir las membranas celulares. La vitamina E se encuentra en las membranas biológicas protegiéndolas de éstos efectos. La vitamina E y el selenio son los dos factores importantes en la inhibición de la peroxidación de los AGPI y por ende de la estabilidad de las membranas.

La vitamina E se encuentra en mayor concentración en la leche materna que en la de vaca (Portela et al, 2003) lo que resulta ventajoso en función de su capacidad antioxidante, si se tiene en cuenta la mayor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de la leche humana.

Esta vitamina no ha sido estudiada en el contexto de los suplementos alimenticios maternos, excepto en lo que se refiere al estudio realizado por Kramer et al, en el que se observó que la sustitución de la manteca de cerdo por aceite de girasol en la dieta daba lugar a un incremento del 50% en las concentraciones de vitamina E en la leche. El uso copioso de cremas de vitamina E por parte de las madres podría dar lugar a la exposición de los lactantes a dosis importantes a consecuencia de la absorción materna y también indirectamente cuando las cremas se aplican sobre las manos. Los niveles de  $\alpha$ -tocoferol son elevados en el calostro en una época en la que el recién nacido depende de manera importante de su efecto fisiológico como antioxidante y para la prevención de la anemia hemolítica atribuida a la deficiencia de vitamina E.

El consumo materno de vitamina E puede por tanto influir en los niveles de esta vitamina en la leche. Sin embargo, no hay pruebas que indiquen que se produzca una deficiencia de vitamina E en los individuos con una absorción normal de las grasas (National Academy of Sciences, 1991)

La vitamina A interviene en el proceso de la visión y es necesaria para el crecimiento normal, la reproducción, el desarrollo fetal y la respuesta inmunológica (*Portela MLPM de, 2003*). Su concentración en la leche humana es variable, ya que depende de la ingesta materna (*Canfield LM, 1995*).

Existe una estrecha relación entre el estado nutricional de vitamina A y la capacidad del sistema inmunitario para responder defensivamente. Es por ello que se propuso llamarla vitamina antiinfecciosa (*Underwood, 1994; Sommer, 1993*).

Muchas de las complejas funciones de la vitamina A pueden ser explicadas sobre bases moleculares mediante la existencia de receptores nucleares para metabolitos del ácido retinoico; se considera que por esta vía participan en la regulación de más de 300 sistemas genéticos celulares (*Chytil et al, 1990*)

Investigaciones realizadas en países pobres han puesto en evidencia una asociación entre la carencia de ésta vitamina y la mortalidad infantil por enfermedades infecciosas (*Humphrey, 2002; West, 1991*). En zonas de carencia extrema, la suplementación periódica con ella produce reducciones significativas de la mortalidad infantil (*Fawzi 1993; Rathmathullath, 1990*). Los grupos en mayor riesgo de presentar estados carenciales son las mujeres embarazadas o que están lactando a sus hijos y los niños en edad preescolar.

La vitamina A interviene también en el proceso de crecimiento de los tejidos, por lo que los niños en los primeros meses de vida, cuando la tasa de crecimiento es muy alta, deben ingerir una cantidad suficiente del nutriente.

Las reservas de retinol al nacer son marginales, sólo se dispone de cantidades mínimas; en los niños prematuros el riesgo de sufrir una carencia es más alto (*Geene, 1991*). Aunque la concentración de vitamina A de la leche materna procede de las reservas de la madre, la lactancia protege al niño de la deficiencia y ésta es rara entre los que lactaron. El efecto protector contra la

=====

carencia parece continuar aun después que la lactancia materna finalice (*West, 1996; Mahalanabis, 1991*). Se ha observado que la reserva de vitamina A presente en niños que fueron amamantados puede enfrentar períodos de ausencia de ingesta de la vitamina.

Como la concentración de retinol en la leche materna es generalmente más alta que en la sangre de la madre, se considera que las glándulas mamarias poseen un mecanismo de transporte activo por medio del cual extraen la vitamina de la sangre para asegurar una concentración óptima en la leche materna. Sin embargo, la capacidad de absorción de la glándula mamaria parece responder a la ingesta de vitamina A solamente en las cantidades precisas para satisfacer las necesidades del feto y no más allá; esto es un mecanismo de protección para que no se produzcan signos de toxicidad en los casos de madres que ingieran sobredosis (*Internacional Vitamin A Consultative Group, 1995*)

Aunque las necesidades de vitamina A aumentan durante la gestación, sobre todo al final del tercer trimestre, este incremento se puede obtener de las reservas hepáticas si las madres ingieren alrededor de 800 mg (2700 UI) por día (*Internacional Vitamin A Consultative Group, 1995*). Por tanto, hacia el final de la gestación, un adecuado estado de vitamina A de la madre es importante para que ésta aporte en su leche las concentraciones de la vitamina que el recién nacido requiere. En niños alimentados exclusivamente con leche materna, ésta es su única fuente de vitamina A durante el período neonatal y después.

Las necesidades de vitamina A de la madre durante la lactancia pueden exceder a las de la gestación a causa de la demanda incrementada para remplazar las pérdidas diarias en leche materna.

La suplementación materna con retinol parece producir una mayor proporción de retinol en la leche materna a los 2 meses del parto (*Bahl et al, 2002*)

La principal acción del ácido ascórbico es la de agente antioxidante y reductor; como cofactor en reacciones enzimáticas que intervienen en el normal desarrollo del cartílago y el hueso. Además, estimula la absorción del hierro y actúa en el metabolismo de los depósitos de este mineral. La leche humana normalmente es rica en vitamina C (*Sociedad Argentina de Pediatría, 2001*) y su concentración media es mayor que la de vaca.

Se sabe por diferentes estudios que la concentración de vitamina C en la leche materna está relacionada con el estado vitamínico de la madre. Cuanta más cantidad toma la madre, mayor es la concentración en la leche materna, pero eso sí, un suplemento de vitamina C con una buena alimentación no influye en la concentración de la leche materna, ya que parece ser que existe un nivel de saturación (*Macias C, Schweigert FJ, 2001*).

Se sabe que la concentración de vitamina C en la madre decrece a medida que avanza la lactancia y en algunos casos existe un elevado riesgo de déficit de vitamina C en la misma.

La CDR de vitamina C para las madres durante la lactancia son de 100 mg/día, siendo la ingesta óptima de 120 a 170 mg/día.

La vitamina C participa directamente en el sistema inmunitario, pues se ha comprobado que los leucocitos acumulan en su interior cantidades importantes de la misma, con el fin de evitar la autooxidación. También colabora en la proliferación de linfocitos como respuesta a la mitogénesis. Lo que se relaciona con la producción de leucotrienos y con la actividad antihistamínica (*Macias C, Schweigert FJ, 2001*).

La vitamina C atraviesa la placenta con facilidad ya que la concentración en la sangre del cordón es mayor que en la sangre materna. La leche materna contiene entre 40 y 50 mg/l, en comparación con la leche de vaca que contiene entre 17 y 21 mg/l.

Las necesidades de vitamina C de los lactantes amamantados oscilan entre 50 y 80 mg/día (*Jensen, 1999*), cantidades algo superiores a las que aporta la leche. Según estas cifras, la leche materna sería insuficiente para asegurar los niveles adecuados; sin embargo, se supone que, tal como ocurre con algunos otros compuestos, deben de existir algunos mecanismos que regulan los niveles de vitamina C en la leche, pues los lactantes sanos alimentados con leche humana y sus propias madres no tienen indicado recibir ningún complemento en los primeros 6 meses de vida.

La absorción de vitamina C se produce en el duodeno y en el yeyuno proximal, a través de un transporte activo dependiente de iones y sodio. El transporte del ácido ascórbico se hace a través del plasma, aunque no se han encontrado proteínas específicas que lo vehiculen. El metabolismo en el interior de la célula tiene lugar en forma de dehidroascorbato y la entrada puede ser pasiva, pues utiliza el mismo sistema de transporte que la glucosa. En el interior de los tejidos, la concentración de ácido ascórbico es más alta que en el plasma (*Macías C, Schweigert FJ, 2001*). Algunos tejidos tienen más concentración de vitamina C y un mayor metabolismo, como la hipófisis, el hígado, las glándulas suprarrenales, el páncreas, el encéfalo y los ojos, en los que se sugiere un papel protector antioxidante. En el riñón, la vitamina C tiene una reabsorción tubular a través de mecanismos de transporte dependientes del sodio; cuando la concentración de vitamina excede la capacidad de reabsorción, aparece en la orina el ácido absorbido. A las madres que lactan se les debe recomendar una alimentación que les aporte suficiente vitamina C. Las fuentes que la sostienen son las frutas, las verduras y las hortalizas, así como la leche, las vísceras, el pescado y los huevos.

El contenido en vitaminas de la leche materna se puede observar en la tabla 5.

#### **1.2.4.2.2.- Minerales**

La concentración de minerales está adaptada a los requerimientos nutricionales y capacidad metabólica del niño.

En comparación con los sucedáneos, la leche materna presenta alta biodisponibilidad de minerales, en especial de calcio, magnesio, hierro, cobre y zinc (*Poiffait A, Adrian J, 1993*). Los minerales se encuentran presentes principalmente ligados a las proteínas del suero, al citrato o a la membrana proteica del glóbulo de grasa, a diferencia de la leche bovina, donde la caseína presenta la mayor proporción de minerales (*Harzer G et al, 1996*).

Estas particularidades serían las principales causas de la mejor absorción de estos nutrientes.

El aporte total de minerales es bajo, lo que favorece el funcionamiento renal del lactante. En especial, la carga de sodio, potasio y cloruros corresponde a un tercio del contenido en la leche de vaca, lo que permite al bebé conservar el agua disponible para el cumplimiento de otras funciones como el control de la temperatura, sin eliminarla en la orina.

Entre los nutrientes minerales se destaca el aporte de calcio y fósforo, con una relación Ca: P de 2 a 1, lo que asegura su óptima utilización (*Caulfield LE, 1995*).

El 99% del calcio corporal está presente en huesos y dientes en la forma de fosfato de calcio, que otorga dureza y estructura, el 1% restante se encuentra en líquidos extracelulares y membranas celulares. Es responsable de un gran número de funciones de regulación. Su absorción en la leche materna es de 55% contra 38% en leche de vaca (*Poiffait A, Adrian J, 1993*).

El fósforo es un nutriente esencial que participa en un importante número de funciones biológicas. En la leche humana, el 23% se encuentra unido a proteínas (*Harzer G et al, 1996*), aproximadamente el 15% se encuentra en forma de fósforo inorgánico y la cantidad restante aparece unido a lípidos. Su concentración en la leche materna es menor que en la leche de vaca. Se ha destacado la importancia de establecer un límite superior de fósforo para leches artificiales, ya que una excesiva cantidad contribuye a

desestabilizar el nivel de calcio plasmático, con riesgo de hipocalcemia, lo que podría desencadenar una tetania neonatal.

El hierro, además de ser esencial para la producción de glóbulos rojos y el transporte de oxígeno, también interviene en el desarrollo cognitivo (*Lozzov E et al, 1991*). La leche materna es una fuente de hierro de alta biodisponibilidad en los primeros meses de vida; si bien se encuentra en niveles muy bajos, se absorbe más del 70% en comparación con el 30% de la leche de vaca.

Algunos autores (*Flynn A, 1992*) atribuyen la extraordinaria biodisponibilidad a la elevada cantidad de lactoferrina presente. Otros (*Hurrell RF, 1989*) mencionan una conjunción de factores, como la baja concentración de proteínas, calcio y fósforo (inhibidores potenciales de la absorción) y elevadas concentraciones de lactosa y ascorbatos (potenciadores).

El cinc es un mineral esencial para el crecimiento y desarrollo del niño, está involucrado en el normal desarrollo del sistema inmunológico y en otros procesos fisiológicos, forma parte de algunas hormonas, además de ser cofactor de enzimas que intervienen en procesos metabólicos. Su distribución cambia a lo largo de la lactancia (*Poiffait A, Adrian J, 1994*). En la leche madura, alrededor del 30% se encuentra ligado a los lípidos (principalmente en la membrana del glóbulo de grasa), 20% a la caseína y el 50% restante, a componentes presentes en el suero lácteo; los ligandos principales en el suero lácteo son una proteína (albúmina) y un compuesto de bajo peso molecular (citrato) (*Bates CJ, Tsuchiya H, 1990; Casey CE et al, 1995*). Su concentración en la leche materna es inferior a la de vaca pero su biodisponibilidad es muy superior, tal como lo evidencia su eficiencia terapéutica (*Blakeborough P, 1986*) en el tratamiento de la acrodermatitis enteropática (síndrome de malabsorción de cinc, patología hereditaria).

El cobre es un mineral requerido para la utilización del hierro y cofactor de enzimas involucradas en el metabolismo de la glucosa y en la síntesis de hemoglobina, tejido conectivo y fosfolípidos. A pesar de que la concentración

de cobre en la leche materna es baja, es raro encontrar deficiencia en niños alimentados exclusivamente con leche humana (Lonnerdal B, 1998). En cuanto a su distribución, el 80% se encuentra en el suero lácteo, sólo 5 a 15% en la grasa y el resto en la caseína. En el suero, el ligando principal es la seroalbúmina y en menor proporción el citrato y aminoácidos libres (Casey CE et al, 1995). La absorción de este mineral en la leche humana es de aproximadamente 25% mientras que en leche de vaca es de 18% (Lonnerdal B, 1997)

El contenido en minerales de la leche materna se puede observar en la tabla 5.

#### **1.2.4.3.- Otros componentes**

##### **1.2.4.3.1.- Isoflavonas**

La concentración de isoflavonas en la leche materna de una madre lactante sana que recibe en su alimentación una cantidad moderada de soja es de 0,2  $\mu\text{mol/l}$  en relación a valores plasmáticos de 2,0  $\mu\text{mol/l}$  (Franke AA, Cluster LJ, Tanaka Y et al, 1998)

El consumo de soja en madres lactantes puede contribuir a la prevención del cáncer a largo término en los niños, dado que la daidzeína y genisteína pueden actuar como potenciales agentes anticancer (Franke AA, Cluster LJ, Mordan LJ et al, 1998)

Los primeros datos obtenidos sobre fitoestrógenos en la leche materna corresponden a un estudio en madres de Hong Kong, que arrojó valores medios de daidzeína de 3,6 ng/ml y de genisteína de 4,8 ng/ml (Morton MS, Leung SSF, Davies DP et al, 1998)

#### **1.2.4.3.2.- Hormonas**

En la leche materna existen, además de factores de crecimiento epidérmico y nervioso, prolactina, gonadotropinas, hormonas tiroideas, calcitonina y estrógenos.

También contiene insulina, somatostatina y parathormona, aunque no se conoce con detalle el papel que desempeñan estas hormonas en la leche de mujer.

#### **1.2.5.- Cambios de composición en la leche materna**

Como ya se ha expuesto, la leche materna no tiene una composición estática sino viva y dinámica, y sus constituyentes cambian durante el período de lactancia. Por ejemplo, no tiene las mismas características durante el transcurso de la misma toma. Al principio, la leche es más acuosa y calma la sed del niño y es rica en proteínas, minerales, vitaminas hidrosolubles y lactosa. Al finalizar es de color más blanco, con más grasa y vitaminas liposolubles (*Rogers IS et al, 1997*).

La composición de la leche madura, que es la que nos ocupa, cambia durante el curso de la lactancia, aunque no tan marcadamente como en las primeras semanas (*O'Donnell A, Carmuega E, 1996*)

Muchos nutrientes presentan un descenso gradual en su concentración de aproximadamente el 10 al 30% durante el primer año de lactancia. Algunos, como el cinc, descienden en forma marcada (*Rogers IS et al, 1997*).

La fluctuación diurna más notable es el aumento en la concentración de grasas, mientras que el hierro puede aumentar ligeramente (*Ronayne de Ferrer P, 1993*). También las proteínas pueden sufrir pequeños cambios durante el día y durante el curso de la mamada. El calcio no presenta variaciones (*Prentice A, 1996*).

### 1.2.6.- Influencia de la dieta materna en la composición de la leche

Datos recientes sugieren que las similitudes entre madres que viven en diferentes regiones son más notorias que las diferencias. A pesar de esto, se evidencian algunas diferencias regionales, particularmente en la concentración de ciertas proteínas, minerales y vitaminas (*Prentice A, 1995*).

Se desconocen las razones, pero se explicarían, en parte, por la dieta materna y el medio ambiente. El conocimiento de la dependencia o no de la ingesta o de la reserva materna de nutrientes, permite predecir el riesgo de su deficiencia en el bebé; en algunos casos es posible la adecuación nutricional o suplementación de la madre.

Los macronutrientes están poco afectados, dentro de ciertos límites (*Jelliffe DB, 1978; Lonnerdal B, 1986*)

Sin embargo, en madres desnutridas habría una correlación entre la concentración de grasa láctea y el nivel de adiposidad materna (*Jensen RG, 1999; Emmett PM, 1997*). En el lactante habría una adaptación a menores concentraciones de grasa láctea a través de un aumento en el tiempo de amamantamiento (*Tyson J et al, 1992*)

Algunas investigaciones demostraron que los hábitos alimentarios de diferentes grupos poblacionales afectan la composición de ácidos grasos (*Lonnerdal B, 1986*).

El perfil de ácidos grasos se modifica con la dieta materna, de modo tal que la composición de la grasa ingerida se refleja en la grasa láctea. Tanto la dieta previa, que ha determinado la composición de los ácidos grasos del tejido adiposo acumulado durante el embarazo, como la dieta actual, son los principales determinantes de la composición de ácidos grasos de los triglicéridos de la leche. Una dieta rica en ácidos grasos poliinsaturados determina mayor contenido de éstos en la leche. Una dieta con predominio de

carbohidratos sobre lípidos determinará síntesis de novo de ácidos grasos en la glándula, con mayor concentración de ácidos grasos saturados de cadena media (*Mena P, Milad M, 1998*). Cuando la madre se encuentra en balance energético, los ácidos grasos derivados directamente de la dieta representan alrededor del 30% de los totales, mientras que cerca del 60% proviene de la síntesis tisular y de los depósitos adiposos (*Emmett PM, Rogers IS, 1997*). No hay evidencias de que el colesterol y los fosfolípidos de la leche humana puedan modificarse con la dieta materna (*National Academy of Sciences, 1991*)

La ingesta proteica materna no modifica los niveles de proteína total. Sin embargo, puede provocar modificaciones en la proporción relativa entre las proteínas del suero lácteo y la caseína (*Ronayne de Ferrer PA, Sambucetti ME, 1993*)

También tiene efectos sobre el nitrógeno no proteico (*Lonnerdal B, 1986*). En lo que respecta a los factores de defensa, la información existente es conflictiva, ya que se observan discrepancias en la literatura.

Al analizar fracciones proteicas individuales, algunos investigadores demostraron que las madres desnutridas producían leche con niveles más bajos de IgA y lactoferrina, mientras que otros autores no encontraron diferencias en el contenido de estas proteínas antiinfecciosas (*Chang SJ, 1990; Hennart PF et al, 1991*)

La lactosa es el parámetro de mayor estabilidad ante la variación de la dieta materna, incluso ante situaciones de desnutrición o suplementación. Con respecto a los minerales, el yodo y el selenio se encuentran entre los que son dependientes de la dieta materna. Por el contrario, el calcio, hierro, cinc y cobre no se verían afectados por la dieta.<sup>46</sup> Sin embargo, se ha observado que las concentraciones lácteas de hierro, cinc y cobre podrían variar según el área geográfica (*Salmenpera L et al, 1994; Okolo SN, 2000*)

Para el caso del cinc, algunos autores encontraron diferencias en el contenido de este mineral en leches de madres de países desarrollados y en vías de desarrollo, lo que significaría que su concentración dependería de la

ingesta (*Krebs NF, 1998*) mientras que otros no encontraron diferencias (*Casey CE, 1995*). Algunos trabajos mencionan que la suplementación de cinc en la madre no mejora el nivel lácteo pero sí disminuye el descenso de la concentración del mineral que ocurre en el transcurso de la lactancia (*Krebs NF et al, 1995*). Por otra parte, la ingesta de cinc durante la gestación estaría correlacionada con los niveles lácteos de cinc (*Ortega RM et al, 1997*).

La dieta materna generalmente no afecta la concentración de calcio de la leche. Se observó que los niveles del mineral en mujeres suplementadas y no suplementadas son similares (*Prentice A et al, 1995*). Por otra parte, en poblaciones con consumo habitual reducido de calcio, la leche materna presentaría concentraciones bajas de este mineral (*Prentice A, 1994*). En algunos trabajos se mencionó que su contenido dependería de la ingesta de calcio durante el embarazo (*Prentice A, 1994; Ortega RM, 1998*).

La deficiencia de cobre en adultos es rara. No se informaron datos de anormalidad.

En el caso de la vitamina A, su concentración estaría en relación directa con la alimentación y reservas de la madre, ya que la suplementación no se ve reflejada en el contenido lácteo hasta que los depósitos maternos están cubiertos (*Canfield LM et al, 1995*).

Con respecto a la vitamina D, los efectos de la suplementación materna son muy variables (*Lammi-Keefe CJ, 1995*).

El efecto de la dieta materna sobre las vitaminas E y K requiere mayores estudios (*Canfield LM et al, 1995; Lammi-Keefe CJ, 1995*).

Con respecto a las vitaminas hidrosolubles, en general se observa una estrecha relación de la concentración de tiamina, riboflavina, B<sub>6</sub>, B<sub>12</sub> y C en la leche materna y la dieta de la madre (*OMS, 2001*). Las reservas de estas vitaminas en el lactante son bajas y se deplecionan rápidamente, lo que los hace muy dependientes del aporte (*Sociedad Argentina de Pediatría, 2001*).

## 2.- ESTRÉS OXIDATIVO EN EL RECIÉN NACIDO

Debido al paso de un ambiente intrauterino, con una presión de oxígeno baja a un ambiente extrauterino, con una presión de oxígeno casi cinco veces superior, así como a diversos procesos implicados en la propia finalización de la gestación y el propio trabajo de parto, el recién nacido se enfrenta a una elevada concentración de radicales libres (*Hong J et al, 2007*). Esta incrementada producción de radicales libres debe de ser controlada por el sistema de defensa antioxidante del neonato, cuya maduración corre paralela al desarrollo de la gestación (*Ripalda et. al., 1989; Frank et. al., 1996*), siendo esta la causa de que los recién nacidos prematuros muestren mayor agresión oxidativa, al presentar un sistema de defensa antioxidante más inmaduro (*Ochoa et.al., 2003*).

La formación de radicales libres es un proceso continuo que a su vez genera una interrelación con las moléculas del entorno de dichas sustancias, motivando un daño que se conoce como estrés oxidativo (exceso de radicales libres en relación a los sistemas encargados de neutralizarlos).

En muchos casos, no obstante, los radicales libres cumplen una función fisiológica predeterminada en los seres vivos, bien formando parte de sistemas enzimáticos (*Stubbe J, 1990*), bien actuando como bactericidas o bien encontrándose involucrados en la síntesis de mediadores inmunes (*Murrell GAC et al, 1990*). Se puede concluir, por tanto, que los radicales libres, por su capacidad de fijación a todo tipo de moléculas, están implicados en una gran variedad de procesos, tanto fisiológicos como patológicos (*Tabla 14*).

Tabla 14. Fuentes de estrés oxidativo en fisiopatología humana

Fuente	Mecanismo
Transporte mitocondrial de electrones	Pérdida de superóxido debido a la reducción ineficiente de oxígeno
Iones metálicos de transición	Cu <sup>++</sup> y Fe <sup>++</sup> : radicales hidroxil
Inflamación	RL liberados por fagocitos activados
Enzimas (xantin-oxidasa...)	Superóxido tras reperusión por isquemia
Drogas (paraquat, paracetamol...)	Intermediarios metabólicos
Humo de cigarrillos	Fase gaseosa rica en radicales libres
Radiación	Rayos X, luz ultravioleta

Los procesos en cuyo daño se implican los radicales libres son de muy variada especie; no obstante pueden citarse las siguientes alteraciones patológicas:

- 1) Desnaturalización de las cadenas de DNA.
- 2) Liberación de factores quimiotácticos que provocan la llegada de leucocitos activados que a su vez generan más radicales libres.
- 3) Inicio de la peroxidación lipídica (con la subsiguiente alteración de membranas), que a su vez genera hidroperóxidos, aldehidos y endoperóxidos, con daño en las proteínas y DNA.
- 4) Desnaturalización de las proteínas presentes en el citosol y las enzimas de membrana, incluyendo el inhibidor de  $\alpha$  1-antitripsina (Nevado A, 2001).

Para mantener el equilibrio entre la presencia de radicales libres en los procesos fisiológicos y su exceso patológico los organismos poseen los denominados *sistemas antioxidantes*, cuya función es el mantenimiento del citado equilibrio (*balance oxidativo*). Los antioxidantes son compuestos con capacidad de inhibir significativamente, a concentraciones relativamente bajas, la tasa de oxidación. Los enzimas antioxidantes catalizan la ruptura de radicales libres habitualmente a nivel intracelular. Cada antioxidante ejerce su función en un locus concreto (*Figura 4*).

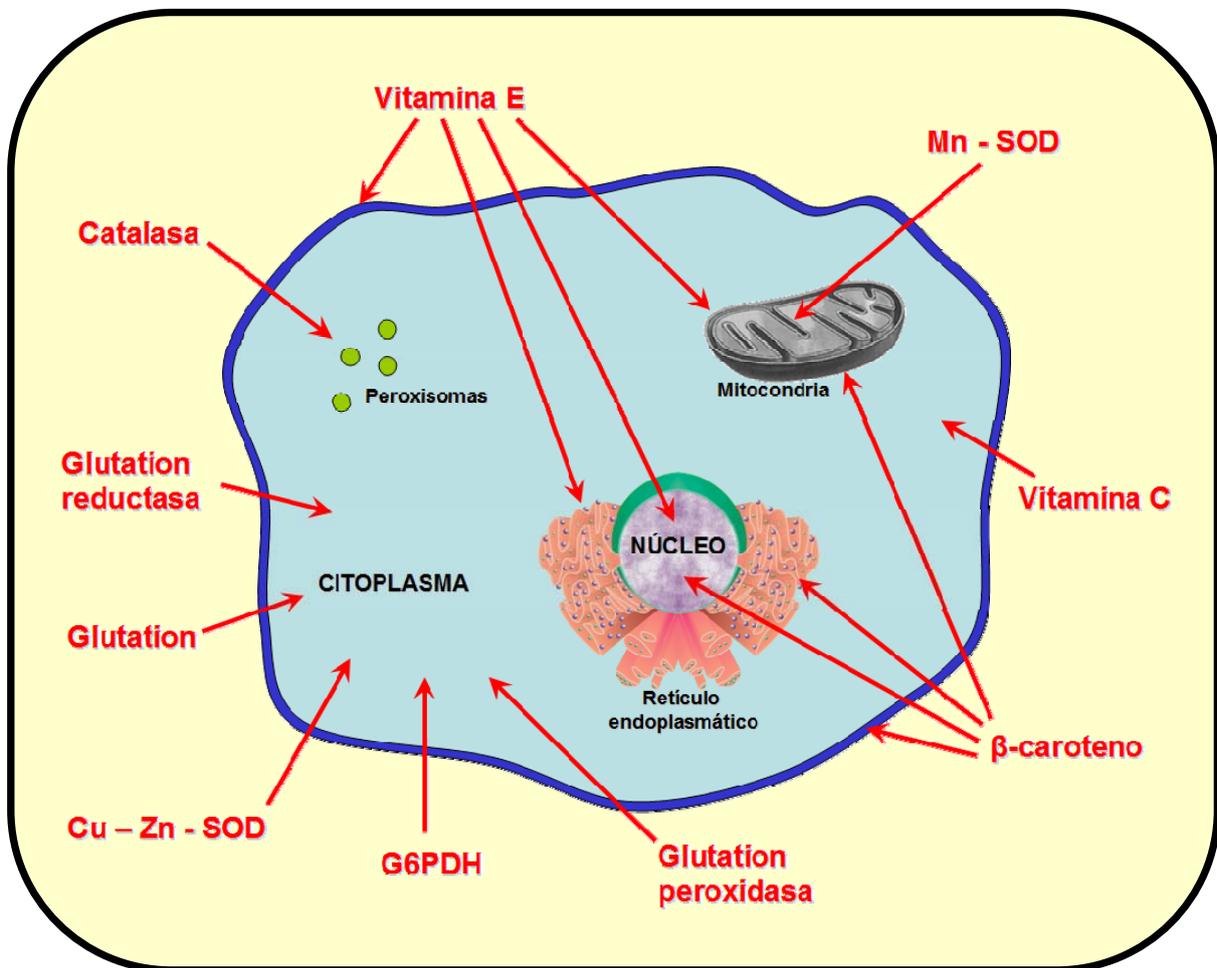


Figura 4. Lugar específico de acción de cada antioxidante

Fuente: Modificado de Fardy Dis, 1995

Así por ejemplo, la catalasa ejerce su acción en los peroxisomas celulares; el  $\beta$ -caroteno y la vitamina E actúan tanto en el núcleo como en la membrana celular, retículo y mitocondria, el glutatión en el citoplasma, etc (Yu BP, 1994). Las *Tablas 15 16 y 17* ofrecen un glosario de algunas de las sustancias con función antioxidante, tanto naturales como sintéticas (Maxwell, 1995). Con posterioridad se tratarán de manera ampliada algunas de las características fundamentales de los principales sistemas antioxidantes. En general puede decirse que el sistema antioxidante primario está constituido por las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), así como las enzimas del ciclo redox del glutatión. El sistema secundario de defensa frente al estrés oxidativo está compuesto, a su vez, de sustancia de muy diversa índole (Molina A et al, 2002).

**Tabla 15. Antioxidantes naturales y sintéticos de uso terapéutico**

<b>Antioxidante</b>	<b>Comentario</b>
<b>Enzimas antioxidantes</b>	
Superóxido dismutasa	Elimina superóxido. Intracelular
Catalasa	Elimina H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . Haem. Intracelular
Glutatión peroxidasa	Elimina peróxidos. Intracelular. Contiene selenio. Previene formación hidroxil. Regenera ascorbato y glutatión NADPH. Detoxifica xenobióticos.
<b>Antioxidantes preventivos</b>	
Transferrina	Transporte de hierro, saturación 20-30%. Lactoferrina, similar en la leche.
Ceruloplasmina	Transporta 90% del cobre plasmático. Actividad ferroxidasa, une hierro a transferrina.
Albúmina	Débil unión de cobre. No daño por RL (alta concentración y turnover). Aporte fundamental de grupos thiol.

Tabla 16. Antioxidantes naturales y sintéticos de uso terapéutico

<b>Antioxidantes por retirada</b>	
Ácido ascórbico	Hidrosoluble, inhibe la lipoperoxidación Regenera la vitamina e. GSH regenera dihidroascorbato celular.
Ácido úrico	Catabolito hidrosoluble de las purinas.
Bilirrubina	Previene la peroxidación de los Ácidos Grasos unidos a la albúmina.
Thioles	Muy abundantes: albúmina y proteínas del plasma. Escasa GSH extracelular (función intracelular). GSH regenerado por otros thioles (NAC).
Tocoferol	Liposoluble (lipoproteínas y membrana). Tocoferil regenerado por el ascorbato.,
$\beta$ -caroteno	Precursor del retinol. Sinergia con tocoferol.
Ubiquinol-10	Forma reducida coenzima Q <sub>10</sub> en lipoproteína. Liposoluble. Regenera tocoferil.
Flavonoides	Polifenoles en frutas, vegetales, té y vino.
<b>Incrementan la actividad de las enzimas antioxidantes</b>	
Superóxido dismutasa	Recombinante y/o natural. Conjugada a albúmina o PEG. A dosis farmacológicas disminuye la unión de neutrófilos a epitelio.
Catalasa	Natural o encapsulada (liposomas o PEG)
Glutation peroxidasa	Actividad aumentada por el Selenio. Ebselen, la mimetiza.
<b>Antioxidantes preventivos</b>	
Desferroxiamina	Quelante del hierro, previene frente a RL ferodependientes.

Tabla 17. Antioxidantes naturales y sintéticos

<b>Antioxidantes por retirada de RL</b>	
Probucof	Reduce la oxidación de lipoproteínas
Salicilatos	Antiinflamatorios, cortan reacción de cadena de RL
21-aminoesteroides	Potente inhibición de peroxidación ferrodpendiente
Manitol	Eliminación de radicales hidroxil
Dimetilsulfósido	Eliminación de radicales hidroxil
Dimetilurea	Eliminación de radicales hidroxil
Otros	Múltiples sustancias. ¿Escasa concentración in vivo?
<b>Inhibidores de la xantinaoxidas</b>	
Alopurinol, oxipurinol	Inhibición de la xantinaoxidas + actividad antioxidante
<b>Inhibidores de neutrófilos y macrófagos</b>	
De NADPH oxidas	Inh. Superóxidos: adenosina, AINEs, calcio antagonistas
Suero antineutrófilos	Destrucción de neutrófilos circulantes
Agentes antiadhesión	Ac monoclonales frente CD11/CD18 Antagonistas de la act. plaquetaria

## 2.1.- Radicales libres

Los radicales libres, se definen como cualquier sustancia (molécula o átomo) capaz de una existencia independiente, que contiene uno ó más electrones no apareados en su última órbita electrónica (*Halliwell B et al, 1992*). Su carga puede ser positiva, negativa o neutra. Su situación energética es, por tanto, muy inestable, por lo que son altamente reactivos y de vida media corta (**Tabla 18**). Su presencia genera una cadena de reacciones de transferencia de electrones con las moléculas vecinas (**Figura 5**), que a su vez se convierten en radicales libres. Sólo en caso de unión de dos radicales libres desaparecerá su actividad como tal (*Cheeseman KH, Slater TF, 1993*).

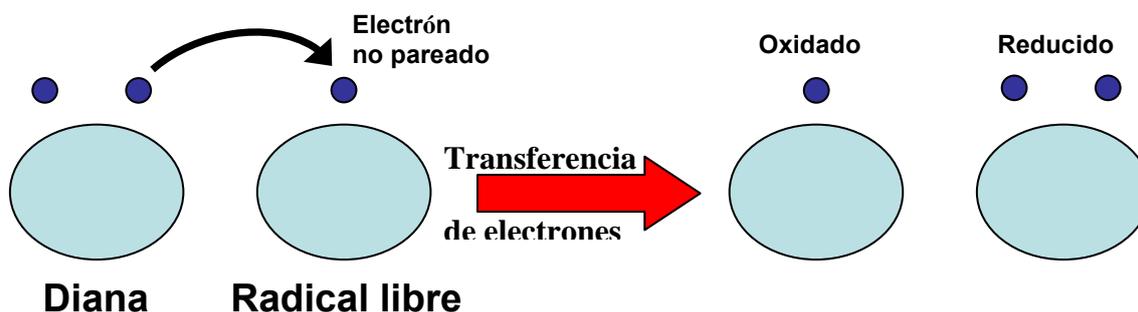


Figura 5. Interacción de un radical libre con una molécula.

El metabolismo aeróbico conlleva hasta un 10% de reducción ineficiente del oxígeno, lo que implica que hasta en sujetos sanos haya un riesgo de exposición a la acción perniciosa de estos elementos.

Tabla 18. Vida media y blanco biológico típico de los radicales libres y especies reactivas del oxígeno (modificado de Reiter. *Front Neuroendocrinol* 1995;16:383-415).

Radical	Nombre	Vida media	Blanco biológico típico
$O_2^{\cdot-}$	Superóxido	$10^{-5}$ s	Enzimas
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno*	Estable	PUFA**
$HO^{\cdot}$	Radical hidroxil	$10^{-9}$ s	Todas las moléculas
$R^{\cdot}$	R-ilo	$10^{-8}$ s	Oxígeno
$RO^{\cdot}$	R-oxilo (alcoxilo)	$10^{-6}$ s	PUFA
$ROO_2^{\cdot}$	R-dioxilo (peroxilo)	7 s	PUFA
$ROOH^{\cdot}$	Hidroperóxido		PUFA
$^1O_2$	Singlete de oxígeno	$10^{-6}$ s	$H^2O$
$HOCL$	Ácido hipocloroso	Estable	Varios
$NO^{\cdot}$	Radical de óxido nítrico	-1s	Varios

\*Aunque El  $H_2O_2$  no es estrictamente un radical libre a altas concentraciones posee cierta toxicidad. \*\*Ácidos grasos poliinsaturados. R= habitualmente, un radical lipídico

La interrelación de los radicales libres con las moléculas de su entorno produce un daño denominado estrés oxidativo (que no es sino el exceso de radicales libres), implicado en la patogénesis de una gran variedad de procesos patológicos en el ser humano, en campos tan dispares como la neurología, cardiología, oftalmología, dermatología, gastroenterología, nefrología, o gerontología (Davies KJ, 1995; Reiter RJ, 1998). Se consideran cuatro sistemas celulares básicos como elementos diana del daño producido por los radicales libres: la respiración aeróbica, la síntesis de proteínas, la membrana celular y el ADN de la célula (Cheeseman KH, Slater TF, 1993).

En biología humana el estrés oxidativo procede de variadas fuentes, que se resumieron en la tabla 14, en la que se aprecia cómo los radicales libres no sólo se generan por la producción a partir de oxígeno, sino que existen otras moléculas que los producen, procediendo generalmente de cadenas metabólicas. Existen en los seres vivos unos variados mecanismos antioxidantes, que previenen o retardan la oxidación y el daño por radicales libres. Este equilibrio entre sistemas de daño celular y sistemas de prevención o reparación de dicho daño se puede ver alterado en determinadas enfermedades y situaciones patológicas.

La producción de radicales libres puede ser tanto de forma accidental como secundaria a la realización de determinados procesos fisiológicos. Así, algunas enzimas poseen en su centro activo un radical libre, como en el caso de la ribonucleótido reductasa (Sevanian A, 2006). En otros casos los radicales libres son producidos por los fagocitos para el cumplimiento de su función bactericida (Babior BM, 1998). Ya expuestos de forma resumida en dicha tabla 14, se ampliaron en las tablas 15 a 17 los elementos productores de radicales libres más importantes.

### **2.1.1.- Tipos de radicales libres**

Entre los radicales libres, destacan por su importancia los derivados del oxígeno, tanto por su abundancia como por su lesividad. Se agrupan genéricamente bajo el término “especies reactivas del oxígeno”, contribuyendo

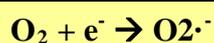
a la denominada “toxicidad del oxígeno”. Destacan el anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) y el radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). Como ya se ha comentado anteriormente, las radicales libres se encuentran en un continuo proceso de formación y transformación, tanto de modo fisiológico como de forma accidental. Es por ello evidente la necesidad de la existencia en los organismos vivos de sistemas fisiológicos de defensa antioxidante y de reparación del daño producido por los radicales libres (Fridovich I, 1989). En la **Tabla 19** se muestran algunos ejemplos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ERO).

Tabla 19.- Ejemplos de radicales libres y especies reactivas de oxígeno

Radical	Nombre	Moléculas diana
$O_2^{\bullet-}$	Superóxido	Enzimas
$H_2O_2$	Peróxido de hidrógeno	Ácidos grasos insaturados
$HO^{\bullet}$	Hidroxilo	Todas las moléculas
$R^{\bullet}$	R-ilo	Ácidos grasos insaturados
$RO^{\bullet}$	R-oxilo	Ácidos grasos insaturados
$ROO^{\bullet}$	R-dioxilo (peroxilo)	Ácidos grasos insaturados
$ROOH$	Hidroperóxido	Ácidos grasos insaturados
$^1O_2$	Oxígeno singlete	Distintas moléculas
$NO^{\bullet}$	Nitroxilo	Distintas moléculas
$CCl_3^{\bullet}$	Triclorometilo	Oxígeno

#### 2.1.1.1.- Radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ )

Se produce como consecuencia de una reducción monovalente o monoelectrónica del oxígeno molecular:



Aunque se trata de una especie menos reactiva que otros radicales, participa en numerosos procesos citotóxicos (*Fridovich I, 1979*) a través de un mecanismo indirecto, esto es, sirviendo como fuente para la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  u otros radicales libres y como reductor de iones metálicos de transición (*Cheeseman KH, Slater TF, 1993*).

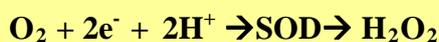
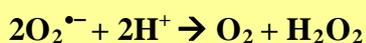
La fuente principal de producción de este radical libre es, como ya se ha citado con anterioridad, la cadena mitocondrial de transporte de electrones (*Borevis A, Chance B, 1973*)

Otros locus productores son las reacciones catalizadas por la xantino-oxidasa y la aldehído oxidasa, la citocromo P450 a nivel del retículo endoplasmático hepático, y la autooxidación de moléculas como catecolaminas, ascorbato, tioles, hidroquinonas, hemoproteínas, etc (*McCord, JM, 1989*).

A pH fisiológico menos del 1% del superóxido se encuentra en su forma protonada (*Cheeseman KH, Slater TF, 1993*), esto es en forma de radical perhidroxilo ( $\text{HO}_2\cdot$ ), la forma más reactiva y cuya tendencia "in vivo" es reaccionar con lipoperóxidos formados, lo que da lugar a radicales peroxilo (*Bielski BHJ, 1983*). Sin embargo a pH ácidos el anión superóxido podría protonarse en mayor tasa.

#### 2.1.1.2.- Peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un metabolito del oxígeno intracelular. Su formación se basa en la dismutación del anión superóxido, catalizada por la superóxido dismutasa (SOD) o directamente, por reducción bivalente del oxígeno:



=====

Su actividad química, al igual que la del anión superóxido, es limitada. Aunque en sentido estricto no es un radical libre, ya que no presenta electrones desapareados, su capacidad de atravesar membranas biológicas y el hecho de poder generar radicales hidroxilo hacen que se consideren como tal (*Chance B, 1979*)

De hecho, su acción citotóxica fundamental es ejercida no de forma directa sino a través de sustancias con mayor reactividad producida a partir del peróxido de hidrógeno y otro agente reductor o un ión metálico como el hierro en su forma ferrosa (*Czapski, G, 1983*)

En condiciones normales las mitocondrias constituyen la principal fuente de producción de  $H_2O_2$ . Cuando se produce un aumento de la presencia de oxígeno, como ocurre en casos de hiperoxia, la producción del radical  $H_2O_2$  aumenta (*Chance B, 1979*). Los peroxisomas y el citosol celular constituyen, respectivamente, el segundo y tercer centro de producción más frecuente de esta especie reactiva del oxígeno (*Borevis A, Chance B, 1973*).

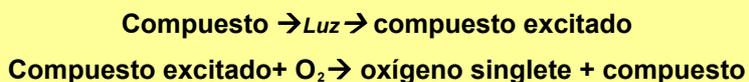
### **2.1.1.3.- Radical hidroxilo (OH·)**

Se trata del radical más reactivo de entre todos aquéllos derivados del oxígeno, siendo capaz de reaccionar de modo directo con cualquier sustancia o molécula cercana. Su principal fuente de producción la constituye la descomposición del peróxido de hidrógeno en presencia de metales de transición, fundamentalmente hierro y cobre, como ya se ha comentado previamente. De forma genérica se citan las siguientes vías de síntesis de OH·: a) Fisión del agua provocada por exposición a radiaciones ionizantes; b) Reacción de Fenton (ya expuesta en el apartado anterior); c) Fotones del peróxido de hidrógeno; d) interacción radical-peróxidos orgánicos; d) reducción del ozono por transferencia electrónica.

Al radical hidroxilo se le considera uno de los principales iniciadores de la peroxidación lipídica (*Ursini F et al, 1982*), de la que se hablará con posterioridad.

#### 2.1.1.4.- Oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ )

Su producción se basa en la absorción de energía por parte de un átomo de oxígeno que motiva un cambio en la disposición de los electrones por alteración de la orientación de uno de sus espines. En la Naturaleza, esto suele acontecer fundamentalmente cuando determinadas sustancias reciben energía lumínica en presencia de oxígeno (*Halliwell B et al, 1993*).



Compuestos con esta capacidad de fotosensibilidad y formación de oxígeno singlete son los colorantes, ciertas drogas como las tetraciclinas y sustancias presentes en el cuerpo humano como la bilirrubina, las riboflavinas y las porfirinas (*Halliwell B, 1993*). Otras vías de producción menos frecuentes son la interacción del ozono con ciertas moléculas y la interacción entre peróxidos (*Kanofsky JP, 1991*).

La capacidad lesiva de esta especie radica en la reacción directa con macromoléculas como los ácidos grasos (*Sevanian A, 2006*), lo que motiva su inclusión en el grupo de los radicales libres, si bien no se trate de uno de ellos *sensu stricto*.

#### 2.1.2.- Defensas endógenas contra la acción de los radicales libres

Los seres vivos disponen de unos complejos sistemas que tienen como misión la minimización del daño producido por el estrés oxidativo, con el objetivo fundamental de mantener el llamado “equilibrio oxidativo”. Los mecanismos antioxidantes conforman un complejo primario de defensa,

compuesto fundamentalmente por la catalasa, la superóxido dismutasa, y las enzimas del ciclo redox del glutatión (GSX, GR, G6PDH) y un complejo secundario, en el que se integran sustancias de diversas características morfoquímicas (*Molina A et al, 2002*).

Los diferentes tejidos y órganos de los seres vivos presentan una sensibilidad también diferente a la acción de los radicales libres, en parte debido a la gran variedad de elementos con capacidad antioxidante y en parte a la diferente concentración de los mismos en las distintas estructuras (*Nevado A, 2001*).

De forma esquemática, los mecanismos antioxidantes pueden catalogarse en enzimáticas (destacando entre ellas las que componen el complejo primario antioxidante) y no enzimáticas. A continuación se resumen algunas de las características fundamentales de algunos de estos elementos.

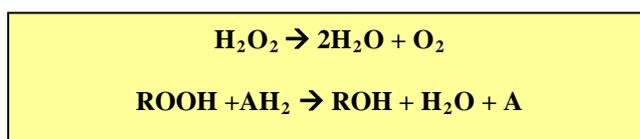
#### **2.1.2.1.- Mecanismos enzimáticos**

##### **A. Catalasa**

De distribución muy amplia, se trata de una enzima ferroporfirínica intracelular, cuya localización principal son los peroxisomas (80%) y el citosol de las células (*Nieto N, 1993*). La concentración de catalasa varía, pues, en las diferentes estructuras celulares, y entre los diferentes tejidos del organismo, siendo su concentración plasmática baja (*Ramon JR, 1993*), en tanto que abunda y es muy activa tanto en hígado como a nivel eritrocitario (*Nieto N, 1993*). Por otro lado, existen diferencias significativas en la actividad catalasa eritrocitaria entre las distintas etapas del ser humano, en la edad pediátrica y en la vejez. Además, se han detectado diferencias de actividad catalasa entre sexos, con una mayor actividad en mujeres en mayores de 70 años de edad, lo que podría ayudar a explicar la mayor longevidad en este sexo (*Casado A, López-Fernández ME, 2003*). La actividad catalasa en plasma es significativamente mayor, según datos de Georgeson et al (*Georgeson GD et*

al, 2001) en recién nacidos a término, así como en aquellos neonatos nacidos mediante parto eutócico, frente a los nacidos por cesárea y los prematuros. Estudios in vitro realizados para valorar la actividad catalasa en la leche materna tanto de madres con hijos prematuros como de madres con hijos nacidos a término no reflejan diferencias entre ambos grupos, y sí una mayor protección antioxidante que la ofrecida por la leche de fórmula (Friel JK, 2003).

La función de la catalasa es doble: por un lado cataliza la descomposición de peróxidos de hidrógeno en agua y oxígeno, en tanto que también ejerce una función peroxídica, produciendo la oxidación de donadores de hidrógeno como el metano, los fenoles o el etanol con consumo de peróxidos como el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Aebi H, 1984).



El predominio de la reacción catalítica o peroxídica depende tanto de la concentración de peróxido de hidrógeno en el sistema como de la concentración de donadores de hidrógeno. La descomposición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por parte de la catalasa es bastante rápida, sin embargo, su afinidad por el mismo es baja, por lo que se requieren altas concentraciones para su descomposición (Monte, M, Sacerdote de Lusting E, 1994).

El papel antioxidante de la catalasa es fundamental, considerándose el antioxidante celular más importante cuando se libera de las células necrosadas, limitando el daño causado por los radicales libres (Molina A et al, 2002).

## B. Superóxido dismutasa (SOD)

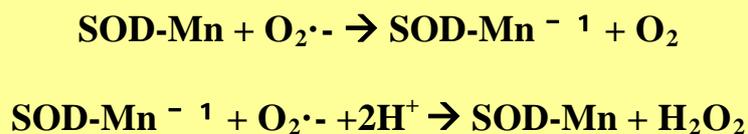
Se trata de un conjunto de metaloenzimas, cuya característica funcional fundamental es la aceleración de dismutación espontánea del radical superóxido hacia peróxido de hidrógeno y oxígeno.



Se distinguen tres grandes familias de SOD: dos de ellas son de localización intracelular, las *SOD cobre/zinc dependientes*, o citoplasmáticas, y las *SOD manganeso dependientes* o mitocondriales, en tanto que la *Esc-SOD* es de localización extracelular. La distribución de la SOD es muy amplia a nivel tisular, con excepción de la Mn-SOD, que no se localiza a nivel eritrocitario; todas ellas ejercen un importante papel en el control de los niveles de radical superóxido a nivel celular (*Monte, M, Sacerdote de Lusting E, 1994*).

El gen de las Cu. Zn SOD se localiza a nivel del cromosoma 21 en seres humanos. El de la Mn-SOD está en el cromosoma 6, en tanto que las SOD extracelulares tienen su gen radicado en el cromosoma 4 (*Monte, M, Sacerdote de Lusting E, 1994*).

El mecanismo general de la actuación de las SOD, ya expuesto, se resume en la siguiente ecuación:



La actividad SOD a nivel eritrocitario, según lo aportado por Ripalda et al, no experimenta variaciones estadísticamente significativas al ser comparada entre pretérminos, recién nacidos a término y adultos. En el período neonatal, su actividad puede verse influenciada por factores como la anoxia fetal, la acidosis respiratoria y la acidosis metabólica (Li X, 2002). Otros trabajos refieren una menor actividad tanto de la SOD como de la catalasa a nivel hemático tanto en prematuros como en recién nacidos con hipoxia crónica (Litvinenko LA et al, 2002). La administración exógena de SOD ha sido testada en diversos estudios para prevenir la aparición de la enfermedad pulmonar crónica del prematuro. La eficacia de uso de SOD en la prevención de dicho proceso, no ha sido suficientemente probada hasta el momento según los estudios publicados, aunque sí puede al menos afirmarse su buena tolerancia y la ausencia de efectos secundarios adversos serios (Suresh GK et al, 2001).

### C. Glutation peroxidasa

Se trata de la enzima fundamental para la inactivación del peróxido de hidrógeno y de otros hidroperóxidos de cadena larga, catalizando la reacción de hidroperóxidos con glutatión reducido (GSH), dando lugar a la formación de glutatión disulfuro oxidado (GSSG) y el producto de reducción, a hidroperóxidos.



La actividad peroxidasa, en situaciones de estrés oxidativo la realizan las glutatión transferasas, con aumento de la actividad peroxidasa y disminución de la actividad transferasa (Aniya Y, Nieto A, 1993). En neonatos con shock séptico se ha comprobado que existe un aumento significativo en la actividad GPX sérica, frente a los recién nacidos sin esta patología, secundario probablemente a una contrarregulación frente al aumento de especies oxigénicas que se produce en esta patología. Sin embargo, este aumento de

actividad GPX y otras enzimas antioxidantes no se traduce frente al daño celular en una mayor protección (Batra S et al, 2000).

#### D. Glutation reductasa

La glutatión reductasa (GR) es la encargada de la reducción de NADPH dependiente del glutatión disulfato oxidado (GSSG), jugando, pues, un papel esencial en el mantenimiento de los niveles de glutatión reducido (GSH) (Figura 6).

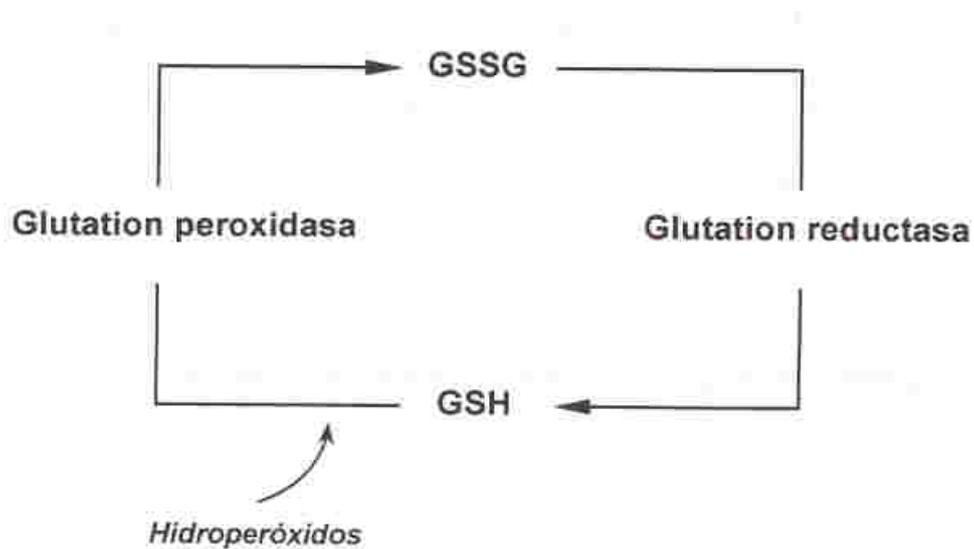


Figura 6. Esquema de la actividad enzimática de la glutatión reductasa

El GSH, como sabemos, juega un papel importante en los fenómenos de óxido-reducción, aunque también actúan en otras funciones celulares (Davydova NA et al, 2008). Por otro lado, ya se ha citado la función del GSH como sustrato donador de hidrógeno en la actividad de la enzima glutatión peroxidasa (Cheung PY, 2002). La actividad de la GSH permite, pues, mantener un elevado índice GSH/GSSG, necesario para la detoxificación de peróxido de hidrógeno, entre otros.

### 2.1.2.2.- Mecanismos no enzimáticos

#### A. Vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol)

El  $\alpha$ -tocoferol es un compuesto constituido por un núcleo hidroxicromona al que se une una cadena de fitilo.

Se conocen al menos 8 formas isoméricas, que se pueden agrupar en dos grupos: cuatro con una cadena saturada de fitilo y cuatro con una cadena de fitilo con dobles enlaces en las posiciones 3', 7', y 11'. Las diferencias entre las formas isoméricas de cada grupo radican en la posición en el anillo de los grupos metilo.

Está considerado el antioxidante natural más efectivo (*de arriba G, 2009*), cuya función se ha demostrado tanto "in vivo" como "in vitro" (*Chow, 1991*).

Destaca su capacidad para la eliminación de oxígeno singlete, entre otros radicales del O<sub>2</sub> (*Cordero MD et al, 2009*).

Su interacción en la fase de propagación de la reacción de peroxidación es bien conocida, eliminando, al parecer, el radical lipídico peroxilo, impidiendo así la formación de nuevos radicales libres (*Liebler DC, 1993*). Hasta el 90% de los radicales peroxilo son inactivados de esta manera (*Machlin LJ, 1991*).

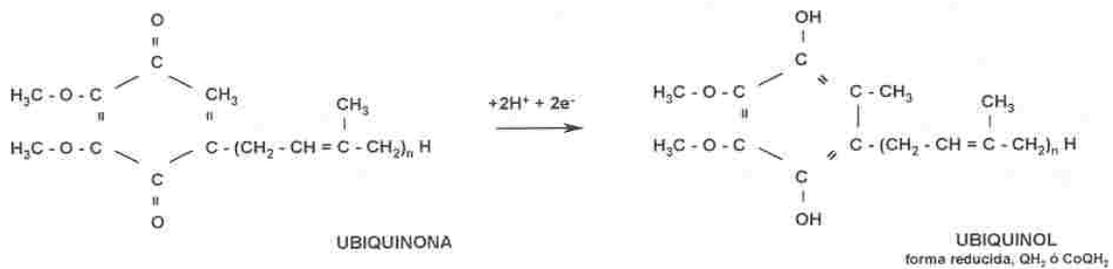
Esta acción sobre este radical peroxilo entre otros, preserva la integridad estructural y funcional de la célula y sus organelas (*Niki E, 1995*).

#### B. Coenzima Q<sub>10</sub> (ubiquinona)

Molécula de gran ubicuidad (de ahí su nombre), su función principal es la de ejercer como transportador móvil en la cadena mitocondrial de transporte de

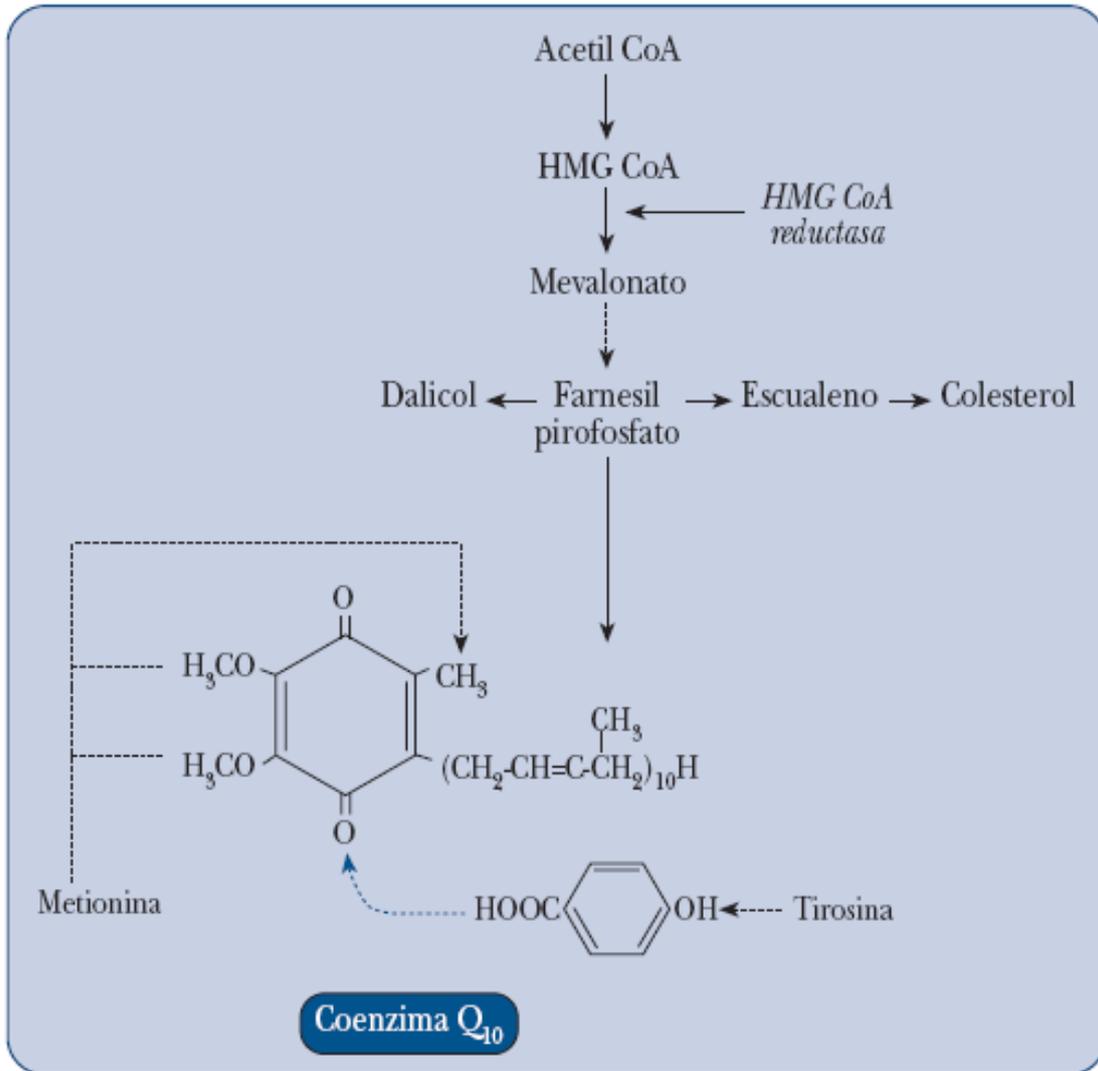
electrones, transfiriéndolos desde los complejos tipo DH al complejo III (**Figura 7**).

Fue descubierta en 1957 por el profesor Fred L. Crane y sus colegas del Instituto Enzimático de la Universidad de Wisconsin-Madison. En 1958, el profesor Karl Folkers y sus compañeros de trabajo en Merck obtuvieron su estructura química.



**Figura 7. Ubiquinona o coenzima Q10**

El CoQ<sub>10</sub> puede provenir de la dieta o bien formarse mediante síntesis endógena. En el caso de síntesis endógena, el anillo proviene del aminoácido tirosina, los metilos del citado anillo de la metionina, y la cadena poliisoprenoide se forma a partir del acetil CoA como material de inicio (**Figura 8**). Esta última ruta, que va hacia el mevalonato y sus posteriores intermediarios, es común con la del colesterol (*Mataix J, 2009*). De hecho el colesterol, el dolicol y el CoQ<sub>10</sub> son los productos finales de esta importante ruta biosintética, que está bajo el control de la enzima hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMGC<sub>o</sub>A reductasa). Los inhibidores de esta enzima ejercen un importante control de represión de la formación de CoQ<sub>10</sub> y de su presencia en sangre (*Mataix J, 2009*).



**Figura 8.- Biosíntesis endógena del CoQ<sub>10</sub>**

Fuente: Mataix M, Ramírez Tortosa MC, 2009

### ***Función antioxidante***

Además de su papel como transportador electrónico, el coenzima Q tiene un importante protagonismo como antioxidante de membrana, papel éste último que ha ido ganando importancia en los últimos años (Tauskela JS, 2007), como lo demuestra el gran número de estudios realizados *in vivo* e *in vitro* a muy diferentes niveles, tales como en vesículas de fosfolípidos, membranas reconstituidas, partículas submitocondriales, mitocondrias, microsomas, células intactas y animales intactos, así como también observaciones a nivel clínico (Tauskela JS, 2007)

Las primeras observaciones en este sentido fueron realizadas por *Lea y Kwietny y Mellors y Tappel*, los cuales demostraron que el CoQ<sub>6</sub>H<sub>2</sub> era considerablemente más potente que su forma oxidada como inhibidor de la peroxidación lipídica y tan efectivo como el α-tocoferol. Un soporte adicional para una función antioxidante del CoQ reducido lo han dado *Booth y colaboradores*, quienes han descrito que la forma reducida es un inhibidor efectivo de la peroxidación inducida por el sistema ascorbato-Fe<sup>2+</sup> en liposomas de fosfatidilcolina de yema de huevo.

En estudios sobre la peroxidación lipídica en partículas submitocondriales de las cuales habían extraído el CoQ y posteriormente reincorporado en varios grados conocidos, se comprobó que la oxidación del succinato se inhibía de forma directamente proporcional con la reincorporación del CoQ (*Tauskela JS, 2007*). Esto se llevó a cabo en liposomas de lípidos mitocondriales dentro de los cuales incorporaron diversas concentraciones de CoQ, los liposomas fueron incubados con partículas submitocondriales, NADH y rotenona, condiciones previas para sufrir peroxidación lipídica. Las observaciones apuntan de nuevo hacia una inhibición de la peroxidación de forma proporcional al grado de reincorporación del CoQ. Estudios adicionales han aportado evidencias en favor de un mayor papel antioxidante de la forma reducida del coenzima Q frente a la forma oxidada, como se ha comentado previamente (*Bhatla N et al, 2009*).

Algunos estudios con animales de experimentación han puesto de manifiesto la implicación del CoQ en cuanto a modificar el nivel de peroxidación inducida por la adriamicina (una antraciclina empleada en la terapia contra el cáncer y caracterizada por la gran capacidad de generación de radicales libres como uno de sus efectos secundarios) y/o manipulación dietética a nivel de la grasa. Así, en un experimento a cerca de lo anterior sobre el contenido en malondialdehído (MDA), CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> en mitocondrias de hígado, el aceite de maíz de la dieta, altamente poliinsaturado, daba lugar a unos niveles de

peroxidación lipídica considerablemente superiores a los correspondientes obtenidos con las dietas ricas en aceite de oliva virgen.

Muchos autores han visto que el CoQ<sub>3</sub>H<sub>2</sub> y el CoQ<sub>10</sub>H<sub>2</sub> son igualmente efectivos como antioxidantes en vesículas sonicadas de fosfolípidos, lo que apoya que la longitud de la cadena poliisoprenoide del CoQ parece no ser por tanto un factor determinante en el mecanismo de antioxidación por este compuesto (Maroz A, *et al*, 2009). Así se ha visto también que tanto las ubiquinonas de cadena corta como las de cadena larga pueden proteger enzimas del ataque oxidativo, tanto en solución como unidos a membrana.

Se ha planteado el hecho de que el CoQ es el único antioxidante liposoluble que las células pueden sintetizar *de novo* y para el que existen mecanismos enzimáticos apropiados para regenerar la forma reducida (Tauskela JS, 2007).

Ha sido demostrado que la forma reducida del CoQ también ejerce su acción antioxidante inactivando la ferril mioglobina, una especie capaz de conducir la peroxidación lipídica a nivel cardiaco y muscular (Bhatla N *et al*, 2009).

Puede, además, actuar como contrarrestador de radicales libres. Otros mecanismos de acción antioxidante son: inhibición de la síntesis de radicales alquilo y peroxilo, mediante reducción directa de especies perferrilo (**Figura 9**); interacción directa con anión superóxido y con radicales alquilo y peroxilo, mediante la donación de átomos de hidrógeno (Kagan VE, 1991; Litarru GP, 1994). También ha sido demostrada la relación de la ubiquinona con la peroxidación lipídica inducida por estrés, bien exógeno (adriamicina) o endógeno (ejercicio), observándose un aumento de los niveles de este compuesto en las membranas lipídicas (Mataix, J.; Mañas, M.; Quiles, J. *Et al*, 1997).

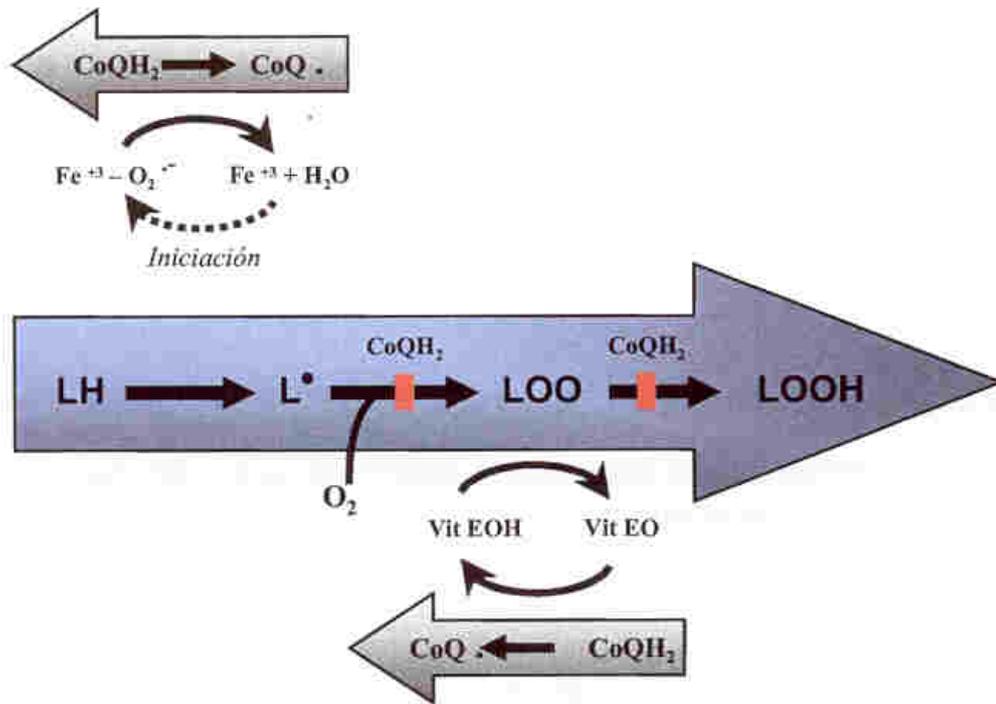


Figura 9. Mecanismos antioxidantes del Co Q.

### C. $\beta$ -carotenos

La actividad antioxidante de estos compuestos se basa en su capacidad para reaccionar con determinados radicales libres, como el peróxido, el hidroxilo, el oxígeno singlete, el anión superóxido, el ácido hipocloroso y otras especies reactivas (*Handelman GJ, 1991*).

Entre los procesos en los que basan su capacidad antioxidante destaca la reducción del daño oxidativo celular inducido por la hipoxantina, la xantino-oxidasa o los polimorfonucleares activados. Son capaces de inhibir la peroxidación lipídica inducida tanto por fuentes enzimáticas de radicales de oxígeno, como el sistema xantino-oxidasa, o el NADPH/citrocromo P450 reductasa (*Sangeetha RK et al, 2009*), como por fuentes no enzimáticas, como las sales de metales de transición (*Hasnain BI, Mooradian AD, 2004*). La mencionada eficacia en la disminución directa de la lipoperoxidación y la

capacidad para modular los niveles endógenos de otros antioxidantes son la base fundamental de la actividad antioxidante de los  $\beta$ -Carotenos (*Zhang J et al, 2006*).

#### **D. Ácido ascórbico (vitamina C)**

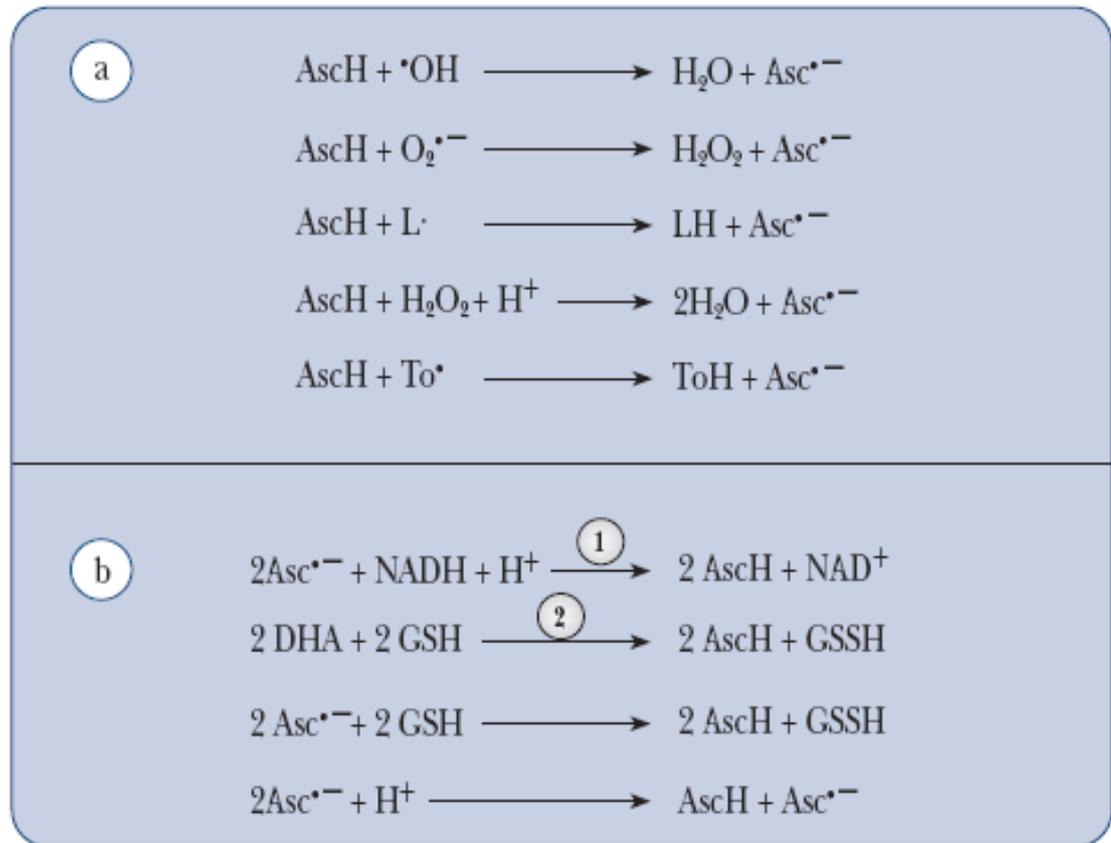
El ácido ascórbico muestra la capacidad de poder sufrir consecutivamente dos procesos oxidativos monovalentes, con la formación del radical semidihidroascorbato como intermediario, siendo éste un radical relativamente estable. Estas características hacen de esta vitamina un excelente antioxidante hidrosoluble donador, siendo para algunos autores el antioxidante plasmático más eficaz (*Gagné A et al, 2009*), al ser el primero en ser consumido, constituyendo por lo tanto la reacción inicial de defensa.

Es capaz de interaccionar directamente con anión superóxido, radical hidroxilo, oxígeno singlete, radicales centrados en el nitrógeno y en el sulfuro y radicales lipídicos, siendo otro mecanismo antioxidante de gran importancia la regeneración del  $\alpha$ -tocoferol mediante la interacción con el radical tocoferoxilo (*Packer L, Fuchs J, 1997*).

Esta interacción es posible gracias a la disposición del grupo fenol activo del tocoferol en la zona polar de las membranas biológicas. Mediante esta interacción la vitamina C además de regenerar el pool de tocoferol activo, protege a la membrana de las posibles reacciones prooxidantes del radical tocoferoxilo (*Ergul Y et al, 2009*). No obstante lo dicho, el fenómeno de regeneración indicado no ha sido confirmado que ocurra en cantidad significativa *in vivo* y son solo los estudios *in vitro* los concluyentes hasta el momento (.).

La regeneración del ascorbato puede ser de tipo enzimático mediante la monodihidro reductasa y la dehidroascorbato reductasa, siendo otras posibles vías a través de reacciones con otras moléculas como el glutatión o por interacción de dos radicales semidihidroascorbato (*Kang JH, 2009*).

En la **Figura 10** se muestra la interacción de la vitamina C con algunos radicales libres, así como los mecanismos de regeneración.



**Figura 10.- Interacción del ácido ascórbico con distintos radicales (a) y mecanismos de regeneración (b).**

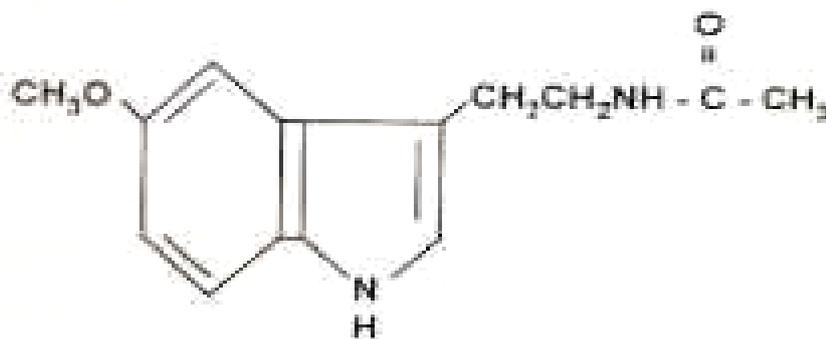
$\cdot\text{OH}$ : radical hidroxilo; AscH: ácido ascórbico;  $\text{Asc}\cdot^-$ : radical semidehidro ascorbato;  $\text{O}_2\cdot^-$ : anión superóxido;  $\text{L}\cdot$ : radical lipídico;  $\text{To}\cdot$ : radical tocoferoxilo; ToH: tocoferol; DHA: dehidroascorbato; GSH: glutatión reducido; GSSH: glutatión oxidado; 1: monodehidro reductasa; 2: dehidro reductasa.

Fuente: Mataix J, Ochoa JJ, 2009

Es importante indicar que ha sido observada una cierta actividad prooxidante para la vitamina C, lo que se explica por su capacidad para reducir metales catalíticos de transición como  $\text{Fe}^{3+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$ , implicados en reacciones generadoras de radicales libres (producción de radical hidroxilo vía la reacción de Fenton). El predominio de una u otra actividad, va a depender de las concentraciones relativas de ascorbato y metales de

transición. También su autooxidación da lugar a la producción de anión superóxido, requiriendo también la presencia de metales de transición. En cualquier caso su potencialidad prooxidante está en principio neutralizada por la actuación de otros antioxidantes y además porque in vivo el hierro se encuentra unido a proteínas como transferrina y ferritina, no estando disponible para las correspondientes reacciones catalíticas (*Packer L, Fuchs J, 1997*). No obstante, la fuerte naturaleza prooxidante del complejo Fe-ascorbato, mostrada in vitro, implica un evidente riesgo de daño oxidativo cuando se toman suplementos de vitamina C por individuos que muestran elevados depósitos de hierro. Por último, no se puede olvidar que el ácido ascórbico aumenta la abrasión intestinal de hierro no hemo (*Kang JH, 2009*).

#### E. Melatonina (aMT) (figura 9)



La 5-metoxi-N-acetil-triptamina o melatonina es una hormona presente en gran cantidad de organismos ontogénicamente muy variados entre sí. Es sintetizada por un gran número de estructuras titulares (*Tan DX et al, 1993*), aunque en mamíferos la principal región productora de melatonina es la glándula pineal (*Gómez-Corvera A et al, 2009*). La biosíntesis de la melatonina, y en general, de otros metoxiindoles, viene determinada fundamentalmente por un impulso nervioso simpático que motiva un ritmo circadiano sincronizado con el ciclo de la luz y que a su vez sufre diversas modificaciones por las hormonas circulantes mediante alteraciones del metabolismo pineal (*Gómez-Corvera A et al, 2009*). Entre las sustancias reguladoras de la producción de aMT

destacan entre otras la N-acetil-transferasa, cuya acción reguladora de la secreción de N-acetil serotonina también está documentada (*Browenstein M et al, 1972*), así como por la Hidroxiindol-O-metiltransferasa, cuya función parece ser fundamentalmente la determinación de la velocidad de síntesis de la aMT, y la MonoAminoOxidasa (MAO)

Son bien conocidos sus efectos reguladores de diversas funciones fisiológicas y de inmunomodulación. No obstante, en los últimos años ha tomado un interés creciente la consideración de la melatonina como una hormona con una importante misión anti-estrés oxidativo, mediante la detoxificación de radicales libres, fundamentalmente radicales hidroxilo (*Escames G et al, 2001*). De hecho Hardeland plantea la posibilidad de que la producción circadiana de aMT se deba a esta función antioxidante (*Hardeland, R, 1993; Verster GC, 2009*). La capacidad de eliminación de radicales hidroxilo se debe a su estructura química; concretamente, estriba en el grupo metilo en posición 5 -OH del anillo indol, mientras que el grupo N-acetil ejerce una acción sinérgica (*Tan DX et al, 1993*).

Además del radical hidroxilo, se ha mostrado la acción antioxidante de la melatonina frente a otros radicales, concretamente los radicales peróxido (*Scaiano JC, 1995*) y el singlete de oxígeno. Además actúa de forma sinérgica con otros conocidos antioxidantes, como las vitaminas C y E. Además, se propugna que esta hormona pueda estimular las enzimas antioxidantes SOD (*Antolín L et al, 1996*) y glutatión peroxidasa (*Barlow-Walden LR, 1995*). La acción de la melatonina resulta facilitada por su capacidad de difusibilidad elevada, debido a su carácter lipofílico, que posibilita que pueda atravesar cualquier barrera morfofisiológica, incluida la barrera hematoencefálica. La función antioxidante y de protección frente al estrés oxidativo de la melatonina, pues, está siendo puesta de manifiesto en diversos trabajos publicados sobre todo en los últimos años y sobre diferentes patologías, como el editado por Ochoa et al realizado in vitro sobre la protección que confiere frente a la peroxidación lipídica y la rigidez de membrana eritrocitaria en pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (*Ochoa JJ et al, 2003*).

## F. Otros antioxidantes

*Glutation*: Tripéptido formado por cisteína, glicina y glutamina. Modulador de diversos procesos bioquímicos y fisiológicos.

*N-acetilcisteína* (NAC) y otras moléculas con puentes sulfhidrilos (captopril, penicilinas): contribuyen a la síntesis de glutatión. La NAC se emplea como tratamiento para la intoxicación por paracetamol, por su acción antioxidante (*de Azeredo MA, 2008*).

*Otras*: Ceruloplasmina, transferrina, albúmina, haptoglobina, hemopexina, ácido úrico, licopeno, luteína, zeoxantina, vitamina, polifenoles, glucosas, bilirrubina (*Romero-Alvira C, González Martínez F, 1992*).

### 2.1.2.3.- Mecanismos de reparación-minimización del estrés oxidativo

Dentro de las enzimas cuya misión es la reparación del daño causado en los ácidos nucleicos por los radicales libres se encuentran las DNA glicosas y las endonucleasas (*Aitken RJ, De Iuliis GN, 2007*). Las peroxidasas, aciltransferasas y lipasas reducen el daño causado a los lípidos (*Cheeseman KH, Slater TF, 1993*), mientras que las proteínas dañadas son eliminadas por diversos sistemas proteolíticos. Litarru refiere que los radicales libres formados en un determinado lugar pueden actuar de factores señalizadores para la llegada y formación in situ de mecanismos frente al estrés oxidativo (Litarru GP, 1991).

#### 2.1.2.4.- Utilidad de los antioxidantes en el embarazo

La utilidad de los antioxidantes en la prevención de las enfermedades, incluso en tratamientos dermatológicos antienvjecimiento, es un tema de actualidad incluso fuera de los ámbitos médicos.

A este respecto se pueden encontrar numerosos trabajos en la literatura en que se investiga el efecto de ciertos antioxidantes en animales de laboratorio al administrarlos artificialmente o en la dieta. Así, en 2001 *Zaken et al* realizaron un estudio en embriones de rata, sometidos a medios de cultivo diabéticos. Demostraron que los factores metabólicos diabéticos tienen un efecto directo en el embrión de la rata, sobre el gen de la superóxido dismutasa y sobre otros genes de enzimas antioxidantes disminuyendo la defensa endógena del embrión frente al estrés oxidativo. Con la administración de vitaminas C y E se conseguía aumentar las defensas antioxidantes disminuyendo el daño oxidativo.

Numerosos estudios como el de *Chelchowska et al*, que en 2004 han investigado el efecto de la suplementación con vitaminas y minerales en los niveles de peroxidación lipídica y en la actividad de la glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa en sangre materna y de cordón umbilical demostrando disminuir el estrés oxidativo en el grupo intervención. Concretamente en este estudio la suplementación se llevó a cabo con un producto denominado VIBOVIT mama (Polfa Kutno S.A.).

La suplementación con melatonina a la mujer embarazada podría aumentar la actividad de las enzimas antioxidantes (*Kedziora-Kornatowska K, 2008*), lo que aportaba una protección indirecta ante el daño causado por los radicales libres, incluso, la melatonina podría utilizarse para el tratamiento de procesos neurodegenerativos causados por el exceso de producción de radicales libres como la hipoxia fetal y la preeclampsia según el grupo de autores que realizó el estudio.

También se han descrito trabajos como el publicado en Polonia en 2003 por *Karowicz-Bilinska et al* donde se evaluó la actividad antioxidativa total en embarazadas tratadas con L-arginina, y cuyo resultado fue que en el grupo intervención disminuía el riesgo de daño causado por estrés oxidativo.

Se ha investigado la posibilidad de suplementar a las gestantes fumadoras, entre otras, ya que se ha podido demostrar en estas pacientes (fumadoras de tabaco) y en sus recién nacidos una menor concentración de vitamina E plasmática y eritrocitaria (*Chelchowska et al, 2004*), lo que podría sugerir que la suplementación con vitamina E en estas pacientes podría paliar los efectos del tabaco. Entre las pacientes con riesgo de desarrollar preeclampsia, por su parte, algunos autores españoles, en un estudio publicado en 2005 encontraron beneficios con la suplementación de vitaminas C y E en la profilaxis de dicha patología (*Rodrigo R et al, 2005*).

En un estudio desarrollado en ratas en 2006, *Cambonie et al* demostraron que los antioxidantes prenatales pueden prevenir enfermedades como la HTA en el adulto, la disfunción vascular y la rarefacción microvascular asociadas a la exposición intraútero a una dieta hipoproteica, concluyen además que el estrés oxidativo perinatal puede producir alteraciones permanentes en el desarrollo cardiovascular.

## **2.2.- Implicaciones de los radicales libres en el embarazo, parto y neonato**

Son múltiples las patologías en las que se aprecia un aumento de la actividad por radicales libres en estas etapas fisiológicas..

### **2.2.1.- Embarazo y parto**

El malondialdehído es uno de los productos de la peroxidación lipídica, comúnmente usado como indicador de estrés oxidativo, pero no puede reflejar el balance entre antioxidantes y prooxidantes, además tiene mucho más valor

predecir la resistencia de los lípidos plasmáticos a la oxidación que cuantificar mediante el malondialdehído el estrés oxidativo (Fogel I, 2005). No olvidar que la mayoría de los estudios están realizados *in vitro*, y que el malondialdehído sólo es uno de los productos de la peroxidación *in vivo*.

La susceptibilidad de los lípidos plasmáticos (LOOH) a la peroxidación en presencia de iones de cobre depende de muchos factores, entre otros del citado balance entre antioxidantes y prooxidantes, resultando en la formación de radicales libres ( $\text{OH}\cdot$ ), que a su vez producirán hidroperóxidos lipídicos ( $\text{LOO}\cdot$ ), que se pueden investigar mediante espectrofotometría dado que absorben la luz con una longitud de onda de 245nm (Schnitzer E, et al, 2007).

Se ha estudiado si el tipo de parto tiene alguna influencia en los parámetros de estrés oxidativo en la circulación fetal, determinando la peroxidación *in vitro* inducida por cobre, mediante la determinación de malondialdehído en el plasma fetal, en algunos estudios se encontró una mayor concentración de malondialdehído en los recién nacidos producto de un parto eutócico que en los nacidos mediante cesárea, concluyendo que la cesárea electiva tiene mejores resultados en lo que a estrés oxidativo se refiere (Rogers MS et al, 1998; Simko M et al, 2002). Pero no todos los estudios coinciden con estos resultados, concluyendo que los niveles de malondialdehído, y por tanto, el estrés oxidativo, es similar entre los niños nacidos mediante parto eutócico y los nacidos mediante cesárea (Fogel I, 2005).

Además se han encontrado diferencias en cuanto a la resistencia a la oxidación de los lípidos plasmáticos de vena y arteria umbilical, siendo mayor en la primera, esto no se puede explicar con unos perfiles lipídicos diferentes, ya que se ha demostrado que no existe tal diferencia (Fogel I, 2005), y podría señalar a un importante estrés oxidativo en el feto independientemente del tipo de parto.

También se ha llegado a la conclusión de que los niños nacidos por cesárea sufren un menor estrés oxidativo que los nacidos espontáneamente (Baydas G et al, 2002), con la determinación de vitamina E en sangre de

cordón umbilical, y con unas concentraciones un poco más bajas de malondialdehído en estos niños, pero que pueden llegar a alcanzar la significación estadística, pero no tienen significación clínica, ya que esta diferencia es demasiado pequeña en comparación con la observada entre arteria y vena umbilical (*Fogel I, 2005*).

Se ha encontrado una correlación entre el pH sanguíneo y los niveles de estrés oxidativo (*Kaya H et al, 2000*), así como entre presión de CO<sub>2</sub> y O<sub>2</sub>, y el exceso de bases (*Fogel I, 2005*).

Son varias las patologías del embarazo en las que se ha demostrado la participación de los radicales libres destacando la preeclampsia y eclampsia, y las infecciones maternas como desencadenantes del parto prematuro.

El desequilibrio entre factores reguladores del tono vascular en la mujer gestante, es responsable en parte de la preeclampsia, enfermedad específica de la gestación humana, caracterizada por la triada clínica de hipertensión, proteinuria y edema, que aparece en la segunda mitad del embarazo.

En ella se produce una disfunción endotelial diseminada, con el resultado hemodinámico para la mujer de una volemia baja con una resistencia alta, lo contrario de lo que ocurre en una gestación normal (*Friedman et al, 1995*). Esta situación acarrea consecuencias importantes para el feto (bajo peso, parto prematuro). Se ha descrito también en esta entidad una reducción de los niveles de inhibición del factor de activación plaquetaria (PAF), un mediador de la inflamación que ya ha sido descrito como un potente activador de las plaquetas conduciendo por un lado a un aumento del tono vascular y por otro a una agregación y degranulación plaquetaria (*Traystman RJ et al, 1991*).

Trastornos parecidos se han encontrado en los casos de crecimiento intrauterino retardado (CIR). En esta patología se ha demostrado también la participación de múltiples mediadores bioquímicos (prostaciclina y tromboxano, endotelina, óxido nítrico...) que alteran la perfusión útero-placentaria (*Neerhof MG, 1995*).

Existen muchas isoformas de la superóxido dismutasa, ya sean citosólicas (dependientes de cobre o zinc) o bien mitocondriales (dependientes del manganeso). Su función en la placenta humana es evitar la acumulación excesiva de superóxidos y el potencial daño oxidativo. Dentro de la placenta, se pueden localizar dos isoformas de la superóxido dismutasa con distribuciones celulares diferentes, lo que lleva a la conclusión de que tienen funciones también diferentes (*Myatt L et al, 1997*). La isoforma dependiente de manganeso se encuentra localizada en el endotelio vascular fetal, y muy escasamente en el sincitiotrofoblasto y el estroma de las vellosidades, podría estar encargada de evitar el daño a este nivel, y en controlar la vida media del óxido nítrico derivado del endotelio, que a su vez, al interaccionar con el anión superóxido, forma el anión peroxinitrito. En las gestantes normotensas, se encuentran niveles muy bajos o inexistentes de estos residuos de nitrotiroxina, lo que indica que se ha formado muy poco peroxinitrito, y que la superóxido dismutasa actúa correctamente. Por el contrario, estos residuos estarán aumentados en la preeclampsia y en los fetos con crecimiento intraútero restringido (*Myatt L, 1996*).

La explicación a este fenómeno es relativamente simple, y no está relacionada con la superóxido dismutasa dependiente del manganeso, sino con el óxido nítrico, ya que es un vasodilatador potente, en estos fetos se encuentra aumentada la expresión endotelial de la óxido nítrico sintasa, para contrarrestar el déficit de flujo sanguíneo que llega al feto, lo cual deriva en un aumento de la formación de óxido nítrico, que facilita la producción de peroxinitritos (*Myatt L et al, 1997*).

Las isoformas de la superóxido dismutasa dependientes del cobre y del zinc se encuentran en el estroma de las vellosidades, su misión es protegerlas de los efectos deletéreos del estrés oxidativo, no se encuentran ni en sincitiotrofoblasto ni en las vellosidades placentarias. Estas localizaciones se pueden ver modificadas en gestaciones complicadas como en la preeclampsia, o el crecimiento intraútero retardado, entonces aparecerán con altas

concentraciones en el sincitiotrofoblasto y en el estroma vellositario (*Myatt L et al, 1997*).

En el parto prematuro se encuentra implicada muchas veces una infección ya sea extra o intrauterina. La presencia de una infección intrauterina, subclínica o clínica, se ha demostrado tras estudio histológico de la placenta y membranas. El papel, entre otros gérmenes, de *Ureaplasma urealyticum* está publicado en numerosos trabajos (*Romero R et al, 1993*). La infección desencadena la producción de metabolitos del ácido araquidónico, y otros mediadores inflamatorios como factor de necrosis tumoral (TNF) por parte de los macrófagos (*Gomez R et al, 1995*), acarreado un aumento de productos prooxidantes.

En cuanto a los mecanismos que desencadenan el parto no se conocen aún en su totalidad. Hay diversos estudios que demuestran la participación del cortisol y las prostaglandinas en dicho evento. En el hipotálamo del feto a término se incrementa la secreción de hormona liberadora de corticotropina, que a su vez estimula la producción de ACTH y como último eslabón cortisol por las glándulas suprarrenales fetales (*Wong DM et al, 2009*). Este aumento de cortisol en estudios experimentales con ovejas origina la activación de la vía terminal común del parto (*Ducsay, 1983*).

Se ha considerado desde hace muchos años que las prostaglandinas son los mediadores clave para el inicio del trabajo de parto, porque pueden inducir contractilidad miometrial, y de echo esto se conoce desde hace mucho tiempo (*Steiner H et al, 1977*), cambios del metabolismo de la matriz extracelular relacionados con la maduración cervical (*Calder AA, et al, 1991*) y activación de la decidua y membranas (*Billah MM et al, 1985*). Si bien los datos de los que disponemos actualmente no prueban que las prostaglandinas sean los únicos mediadores para el inicio del trabajo de parto, apoyan el concepto de que existe un vínculo temporal correcto entre un incremento de las prostaglandinas y el inicio subsecuente de aquel.

Las PG se producen en tejidos intrauterinos (amnios, corion, decidua, miometrio y placenta). Los estímulos que generan su aumento incluyen las citocinas (*Dowling DD et al, 1991*), factores de crecimiento (factor del crecimiento endodérmico), cortisol y otros.

Una vez instaurada la dinámica uterina ocurren de forma periódica periodos de isquemia-reperfusión al compás de las contracciones uterinas con la siguiente formación de metabolitos de las xantinas y formación de radicales libres.

#### **A. Transferencia de gases entre feto y placenta.**

En el momento del nacimiento, tras millones de años de evolución en el hombre, es de esperar que el feto humano normal esté preparado para soportar un trabajo de parto y un parto normales, dando por resultado un binomio de madre-hijo saludable en casi todas las situaciones. Para ello, es necesario que todos los factores implicados se desarrollen con normalidad: estado de salud y nutritivo de la madre, funcionamiento de la unidad feto-placentaria y trabajo de parto. Existen procesos biológicos que permiten que la variabilidad de la gestación y el proceso del trabajo de parto procedan de una manera normal. Estos procesos están basados en la fisiología del transporte de gases a través de la placenta, basados en una interfase sangre-sangre a nivel del espacio intervelloso (*Rankin JH, McLaughlin MK, 1979*).

La transferencia de  $O_2$  de la madre al feto depende de la transferencia de  $O_2$  desde la hemoglobina materna hacia la fetal, que a su vez está determinada por la magnitud de la diferencia de afinidad entre los valores de presión con saturación media de oxígeno ( $p-50$ ) de las hemoglobinas materna y fetal ( $p-50$ ). Las desviaciones de las curvas de disociación de hemoglobina entre sí afectan la  $p-50$ , y por tanto la cantidad de oxígeno dispuesto para su transporte.

La  $p-50$  normal in vivo (de aproximadamente 6 mm Hg) se origina por diferencias del 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) activo en los eritrocitos maternos

y fetales. Las cifras bajas de 2,3-DPG que se encuentran en los eritrocitos fetales dan por resultado un incremento de la afinidad de la hemoglobina fetal por el  $O_2$ . Esta afinidad aumentada mueve con eficacia la curva de disociación de hemoglobina fetal hacia la izquierda de la madre, lo que permite el transporte de  $O_2$  desde la hemoglobina materna hacia la fetal a cualquier  $PO_2$  dada (Bauer C et al, 1969).

Los efectos de *Haldane* y *Bohr* aumentan más la  $p-50$  en la interfase placentaria. El efecto de Haldane comprende la liberación de  $CO_2$  desde la sangre fetal, con desviación de la  $p-50$  fetal hacia la izquierda e incremento de su afinidad por el  $O_2$ , en tanto la captación simultánea de  $CO_2$  e hidrógeno ( $H^+$ ) por la hemoglobina materna desvía esa  $p-50$  hacia la derecha (efecto de Bohr). El efecto neto es una ampliación del gradiente de  $p-50$  de hasta 10 a 12 mm Hg, lo que aumenta la liberación de  $O_2$  desde la hemoglobina materna hacia la fetal, y da por resultado una saturación alta de la hemoglobina fetal a valores de  $PO_2$  bajos (20-30 mm Hg) (Kirschbaum TH, 1963).

La transferencia de  $CO_2$  a través de la placenta se basa en gran parte en la diferencia entre la presión arterial materna y fetal de dióxido de carbono ( $PaCO_2$ ). La rapidez del transporte permite que el proceso sea independiente del flujo (Yeomans ER et al, 1985).

Tanto en la primera como en la segunda etapa del trabajo de parto aparece acidosis materna y fetal, por lo que el gradiente de  $p-50$  materno-fetal se conserva y ambas curvas de disociación se desplazan a la derecha (Antoine C et al, 1982) . Estos cambios, en el feto, se deben a un riego placentario disminuido que se acentúa según se acerca el final del parto. Al mismo tiempo el aumento de  $PCO_2$  materno y fetal crea el impulso ventilatorio fetal que pronto se necesitará.

En síntesis, una vez que empieza el estrés propio del parto, los factores que controlan el transporte de gases están relacionados con los que influyen sobre los efectos de *Bohr* y *Haldane* sobre los valores de  $p-50$  materno-fetal en la interfase placentaria. Así, los factores que influyen sobre el pH y la  $PaCO_2$

materno-fetales se convierten en los factores claves en el grado de asfisia perinatal.

Aún desarrollándose el parto con toda normalidad, el estudio pormenorizado del estrés oxidativo en estos momentos decisivos tanto para la madre como para el hijo demuestra un aumento de los parámetros de peroxidación lipídica que puede conducir a diversas repercusiones funcionales importantes. El proceso del nacimiento se caracteriza por un episodio de hipoxemia obligatoria, seguida por reperfusión. Esta secuencia desencadena el sistema xantino-oxidasa con gran producción de radicales libres, para lo que el feto sano, a término está preparado (**Figura 11**). En los casos en que esté presente algún tipo de patología previa, el neonato tendrá más dificultad para superar dicho estrés.

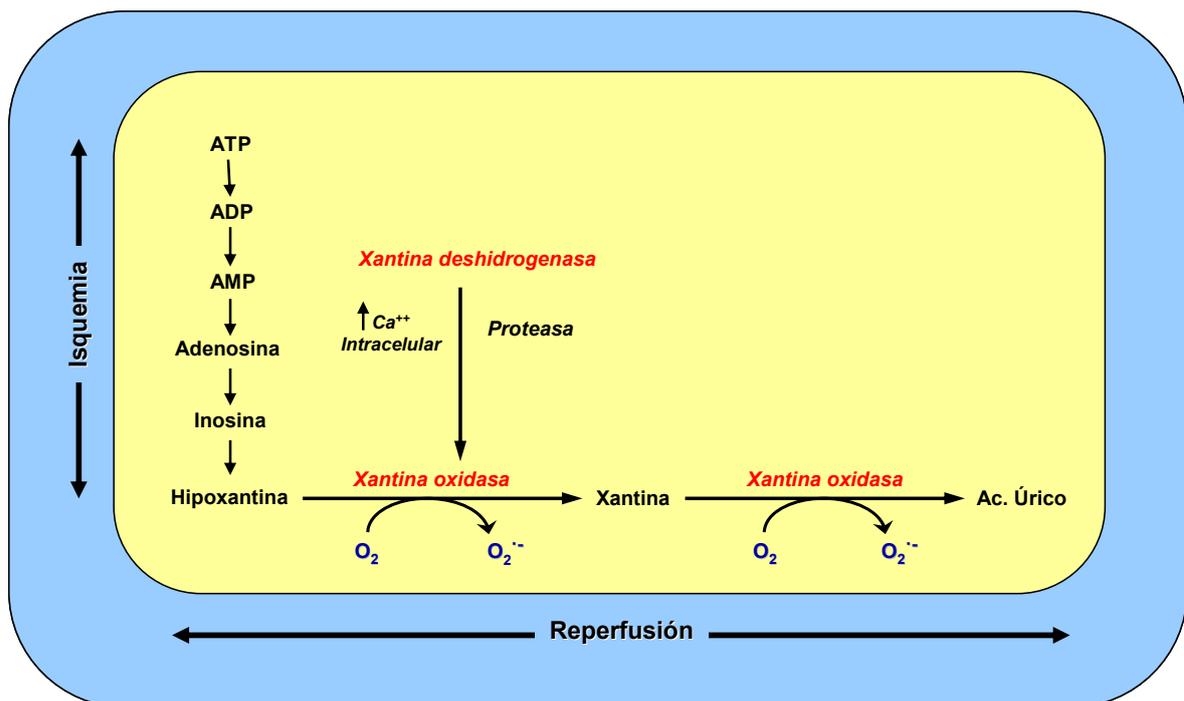


Figura 11.- Esquema del mecanismo de generación de anión superóxido por el sistema xantino oxidasa durante la isquemia-reperfusión

En el útero, el pulmón y otros órganos fetales están expuestos a tensiones de oxígeno hipóxicas (20-25 mm Hg). El tejido placentario permite un adecuado intercambio gaseoso entre los tejidos maternos y fetales,

favoreciendo una oxigenación tisular efectiva y ejerciendo un importante papel desintoxicante sobre el estado redox fetal.

La circulación pulmonar del feto constituye un circuito de resistencia alta y flujo bajo que acepta menos del 10% del gasto ventricular combinado, un estado fisiológico singular que asegura suficiente flujo sanguíneo pulmonar para sostener el crecimiento y desarrollo de los pulmones.

No se entienden por completo los mecanismos que contribuyen a la conservación del alto tono en reposo en los pulmones del feto, pero comprenden factores mecánicos (ausencia de interfase aire-líquido, distensión rítmica), bajas tensiones de oxígeno tanto a nivel alveolar como arteriolar, y un equilibrio entre reguladores del tono vascular (vasoconstrictores y vasodilatadores).

Las células endoteliales son capaces de producir y liberar varios mediadores que actúan en sitios diferentes en células de músculo liso subyacentes, para regular el tono vascular local, de gran importancia en las circulaciones fetal y pulmonar transicional. Entre estas sustancias destacan el óxido nítrico (NO), la endotelina (ET-1) y la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>). El equilibrio e interrelación de estas sustancias vasoactivas entre sí y con la concentración de oxígeno presente en el medio, determinan el éxito del establecimiento de la circulación extrauterina.

Ya en la etapa neonatal, la interrelación y el equilibrio entre los distintos agentes vasoactivos responsables de la regulación del tono vascular determina el que se desarrolle inflamación e hipoxia-isquemia ante distintos desencadenantes.

El fracaso de dicha adaptación en el recién nacido desemboca en situaciones anómalas como persistencia del conducto arterioso, hipertensión pulmonar persistente, patologías en las que están implicadas la disregulación de los factores se alados (Ziegler JW et al, 1995).

## B. Oxido nítrico

El óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) es un gas biológicamente activo, producido por casi todos los tipos celulares del organismo y que participa en muy diversos procesos como la regulación del tono vascular (endotelio), la neurotransmisión (sistema nervioso central y periférico) y la citotoxicidad mediada por células (macrófagos y neutrófilos) (*Bredt DS et al, 1994; Lowenstein CJ et al, 1994*). Debido a su bajo peso molecular (30 Da) y a su naturaleza lipofílica, el  $\cdot\text{NO}$  difunde rápidamente a través de las membranas lipídicas y de las paredes celulares de bacterias y hongos.

La magnitud y la duración de la síntesis de  $\cdot\text{NO}$  por las células determinan que su acción sea fisiológica o patológica. Las acciones fisiológicas son mediadas por pulsos de pequeñas cantidades de  $\cdot\text{NO}$ , las cuales pueden aumentar los niveles de cGMP a través de la nitrosilación del hemo de la guanilato ciclasa, produciendo la dilatación de los vasos sanguíneos, la desagregación plaquetaria y la apertura y cierre de algunos canales iónicos (*Moncada S, Higgs EA, 1991*). Las actividades patológicas son el resultado de la producción sostenida de altos niveles de  $\cdot\text{NO}$ , que pueden inactivar enzimas dependientes de hierro, involucradas en la respiración mitocondrial, en la producción de energía y en la replicación celular. Altos niveles de  $\cdot\text{NO}$  interactúan con un gran número de moléculas blanco, incluyendo aquellas que responden a bajos niveles de  $\cdot\text{NO}$  como la guanilato ciclasa.

Las oxido nítrico sintasas (NOS) catalizan la oxidación de uno de los dos nitrógenos guanidínicos equivalentes de la L-arginina, aminoácido semi esencial, para producir  $\cdot\text{NO}$  y L-citrulina (*Marletta MA et al, 1993*). Otros sustratos requeridos son el oxígeno molecular ( $\text{O}_2$ ) y el NADPH.

La formación de  $\cdot\text{NO}$  procede en dos pasos y consiste en la oxidación de cinco electrones de la L-arginina, dos electrones son provistos por el NADPH para producir  $\text{N}_G$ -hidroxi-L-arginina, seguida de una oxidación de tres electrones del nitrógeno hidroxilado para formar  $\cdot\text{NO}$  (**Figura 12**).

La síntesis de  $\cdot\text{NO}$  se produce de dos formas, una constitutiva de baja producción y otra inducible de alta producción. Los dos tipos de NOS pueden coexistir en la misma célula. Las células endoteliales, por ejemplo, liberan  $\cdot\text{NO}$  por un tiempo prolongado en respuesta a TNF-alfa y sólo brevemente cuando son estimuladas con un agonista de  $\text{Ca}^{2+}$  como la bradiquinina (Capasso *L et al*, 2003). Por otro lado, es interesante considerar que el tratamiento de células endoteliales o macrófagos con TNF-alfa o lipopolisacáridos bacterianos (LPS) puede estimular la NOS inducible pero disminuir el RNA mensajero de la NOS constitutiva.

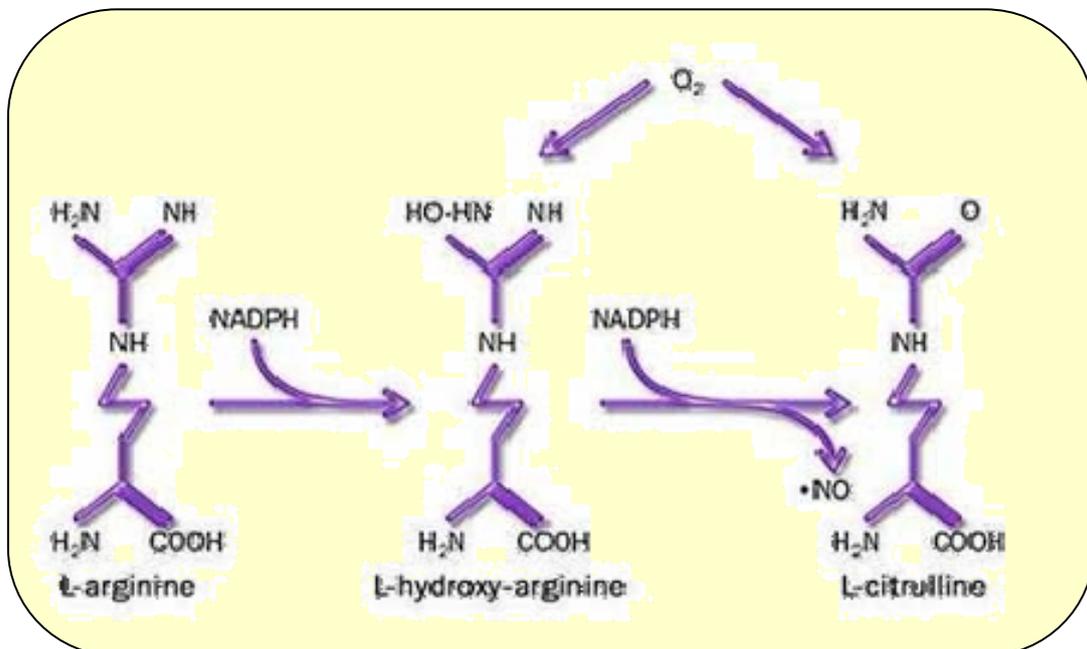


Figura 12.- Formación de  $\cdot\text{NO}$ .

El  $\cdot\text{NO}$  puede actuar dentro de la célula en la cual es generado o difundir a las células adyacentes activando la guanilil ciclasa soluble, lo que resulta en un aumento de los niveles de cGMP. Este aumento puede conducir a la activación de la proteinquinasa dependiente de cGMP (PKG), la fosforilación alterada de muchas proteínas endógenas, la disminución de la actividad de la fosfolipasa C y la disminución del calcio citosólico. La disminución del calcio intracelular es responsable de la relajación mediada por  $\cdot\text{NO}$  del músculo liso vascular y no vascular, de la inhibición de la agregación y adhesión plaquetaria,

de la inhibición de la adhesión leucocitaria y es una señal de transducción del sistema nervioso central y periférico (*Durante W et al, 1992*).

Algunos efectos del  $\cdot\text{NO}$ , como los citotóxicos, son independientes de cGMP y se deben a la interacción directa del  $\cdot\text{NO}$  con un grupo prostético férrico. El  $\cdot\text{NO}$  interacciona con el centro Fe-S de la aconitasa o de algunas enzimas de la cadena mitocondrial de transporte de electrones como la NADH-oxidoreductasa o succinato-oxidoreductasa, alterando el metabolismo energético y la respiración celular (*Castro L et al, 1994*).

También actúa sobre la ribonucleótido reductasa inhibiendo la replicación celular.

La degradación de  $\cdot\text{NO}$  ocurre como consecuencia de la oxidación producida por el anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ), que da lugar al anión peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) (*Beckman JS, 1991*), que a su vez, se degrada a otro agente oxidante, el anión hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), y a nitrato. El  $\text{ONOO}^-$  produce la oxidación de tioles y la nitración de aminoácidos aromáticos de péptidos y proteínas y contribuye al daño oxidativo del DNA (*Chappell LC et al, 2002*).

La NOS también puede ser una fuente significativa de  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ; así, el NO es al mismo tiempo un radical libre y un mediador importante de muchas funciones biológicas.

En los últimos años, trabajos independientes encontraron una  $\cdot\text{NO}$  sintasa funcional en las mitocondrias de hígado de rata (*Ghafourifar P, Richter C, 1997*). Estudios posteriores revelaron que la enzima se localiza principalmente en la membrana interna mitocondrial, en proximidad a los complejos de la cadena respiratoria. La producción de  $\cdot\text{NO}$  medida en mitocondrias permeabilizadas es dependiente de L-arginina y NADPH, y puede ser parcialmente bloqueada por inhibidores de las  $\cdot\text{NO}$  sintasas como la L-NMMA y la L-NIO, sugiriendo que esta isoforma es estructuralmente similar a las  $\cdot\text{NO}$  sintasas ya descritas. La producción de  $\cdot\text{NO}$  por la mitocondria podría estar relacionada con la modulación de la respiración mitocondrial, la

regulación de la disponibilidad de oxígeno y energía de los tejidos y quizás, con la señalización intramitocondrial que desencadena el proceso de apoptosis o muerte celular programada.

### C. Parto pretérmino

El nacimiento prematuro es un problema importante de salud pública, cuya etiología sigue siendo desconocida. Como posibles causas se han propuesto las infecciones intrauterinas (*Dudley DJ 1997*) y sistémicas (*Gibbs RS et al, 1992*); así los radicales libres de oxígeno pueden actuar como transductores de señal mediante la modificación indirecta de la biodisponibilidad de otro radical libre, el NO. El embarazo se caracteriza por una regulación al alza de NO y de GMPc (el producto de la actividad guanilato ciclasa y uno de los segundos mensajeros del NO). Una desviación en el balance redox con el gasto consecuente del NO hacia la formación de ONOO- podría producir efectos relacionados con una relativa falta de NO para sus papeles fisiológicos durante el embarazo así como también la formación directa de ONOO-.

En muchas especies existe una formación aumentada de NO por los vasos sanguíneos y el miometrio con diversas vías de regulación (*Buhimschi CS et al, 1999*). Como el sistema del NO es regulado en el miometrio o la placenta, sobre todo durante la gestación, se ha sugerido que la generación de NO durante la gestación pudiera contribuir al mantenimiento de la quiescencia uterina, mientras que si es retirado antes del parto podría desencadenarlo.

Aunque la inhibición de la NOS en ratas no causa parto prematuro *per se*, si que se potencia el efecto de un antagonista del receptor de la progesterona en la inducción de trabajo de parto pretérmino (*Yallampalli C, 1994*). A este respecto, se ha demostrado que el útero de la rata expresa tanto la NOSe como la NOSi, pero esta última isoforma de la enzima es la que durante el embarazo se regula más (*Sladek SM, 1998*). En cambio este escenario se invierte en el cérvix de la rata con una alta producción de NO, casi exclusivamente producto de la NOSi, que ocurre durante el trabajo de parto y

que modula la colagenólisis asociada con maduración cervical (*Buhimschi I et al, 1995*). La inyección de lipopolisacáridos (LPS9 a las ratas durante el embarazo regula al alza la NOSi en el cérvix, alcanzando valores de NO similares a los observados en el trabajo de parto a término. De cualquier forma, los LPS no afectan la producción de NO en el útero gestante, lo que puede sugerir que la producción de NO en el útero ya se encuentra regulada al alza al máximo de su capacidad (*Buhimschi I et al, 1995*). Estos hallazgos son indicativos de que el NO puede tener diferentes efectos en tejidos reproductivos adyacentes: la quiescencia fisiológica en el útero y la colagenólisis asociada con el reblandecimiento tisular del cérvix.

Las células inflamatorias producen grandes cantidades de  $O_2^-$ , de NO y, por tanto, de ONOO-, lo que contrasta con la generación de NO en útero durante el embarazo, donde solo se producen cantidades mínimas de  $O_2^-$ , y la mayor parte debidas a una baja actividad de una xantina oxidasa endógena. Con la infección intrauterina o corioamnionitis, la formación del ONOO- puede hacer que el NO se desvíe de su papel fisiológico y, así, convertirse en un iniciador crítico de acontecimientos que llevan a procesos que terminan en parto pretérmino y en resultados fetales adversos (*Buhimschi C, Weiner CP, 2001*).

Todos estos estudios sugieren que los radicales de oxígeno están involucrados en la fisiopatología que lleva al parto pretérmino. De ese modo, la prevención o neutralización de radicales libres de oxígeno podría ser el blanco terapéutico ideal para prevenir el parto pretérmino y el compromiso fetal asociado, con el ambiente intrauterino hostil, que se traduce en morbilidad fetal y perinatal (*Buhimschi C, Weiner CP, 2001*).

#### **D. Preeclampsia**

La preeclampsia es una alteración específica del embarazo humano que afecta en forma adversa a la madre (produciendo disfunción vascular) y al feto (mediante limitación del crecimiento intrauterino). Desde la antigüedad, esta

enfermedad lidera la mortalidad materna y perinatal. Se la designó como “la enfermedad de las teorías”, lo que refleja la confusión que rodea sus causas y patogénesis. Sin embargo, en el último año se han realizado avances para aclarar esta patología (*Briceño-Pérez C et al, 2009*).

La preeclampsia se caracteriza por vasoespasmo, aumento de la resistencia vascular periférica y reducción de la perfusión tisular. El síndrome es polimórfico, ya que virtualmente cualquier tejido y sistema orgánico puede ser afectado, se diagnostica por la aparición de hipertensión y proteinuria, los signos así como los síntomas revierten tras el parto.

La patogénesis de la preeclampsia ha sido siempre un enigma y en las últimas dos décadas las hipótesis variaron desde una infección helmíntica hasta isquemia de la placenta (*Howlader MZ et al, 2009*). Sea cual fuere el factor desencadenante primario, prevalece la hipótesis que Roberts propuso hace más de una década, de que la disfunción endotelial era el elemento clave en las diversas manifestaciones de la eclampsia (*Taylor RN et al, 1990*).

Varias líneas de evidencia indican que los cambios adversos en la estructura y función del endotelio vascular materno son los responsables de la reactividad vascular alterada, la activación de la cascada de la coagulación y el daño multisistémico que ocurre en la preeclampsia.

Se propuso que, a semejanza de lo que sucede en la aterosclerosis y la vasculopatía diabética, el estrés oxidativo es un componente de la preeclampsia y constituiría un enlace entre la disminución de la perfusión de la placenta y el síndrome materno. Se han detectado marcadores de estrés oxidativo en la sangre de mujeres con preeclampsia, evaluando el estrés oxidativo en pacientes con preeclampsia y en sus recién nacidos, las enzimas antioxidantes estaban disminuidas y la lipoperoxidación lipídica aumentada, ambas de forma proporcional a la severidad de la patología (*Chamy VM et al, 2006*).

Se han descrito marcadores de estrés oxidativo en el tejido placentario de mujeres con preeclampsia (*Roberts JM, Cooper DW, 2001*).

- Disminución de la actividad de SOD total
- Disminución de actividad de GPX
- Disminución de expresión de Cu Zn SOD
- Aumento de actividad de XO
- Aumento de nitrotiroxina
- Aumento de hidroperóxidos
- Aumento de 8-isoprostano
- Aumento de malondialdehido
- Aumento de leucocitos activados

(SOD: superóxido dismutasa; GPX: glutatión peroxidasa; XO: xantina oxidasa)

La lipoperoxidación se evidencia por la presencia de muchos productos de esta reacción en cadena. Uno de estos productos es el isoprostano, producido por la oxidación del ácido araquidónico catalizada por radicales libres. El isoprostano libre posee actividades de importancia en la preeclampsia y es un poderoso vasopresor, activador plaquetario y mitogénico (*von Dadelszen P et al, 2002*).

En mujeres con preeclampsia, la producción in vitro de hidroperóxidos lipídicos y de tromboxano está aumentada tanto en las células trofoblásticas, como en el tejido de las vellosidades de la placenta. La producción de isoprostanos también está aumentada en el tejido incubado de placenta de mujeres con preeclampsia comparado con tejido de placenta de embarazo normal (*Walsh SW et al, 1993*). Sin embargo, no hubo demostración directa de la acumulación de productos de la lipoperoxidación en la circulación materna.

Se han investigado los hidroperóxidos lipídicos en relación con la actividad de los radicales libres en la preeclampsia y en el síndrome de HELLP, muchos autores concluyen que un aumento en las sustancias reactivas del

tiobarbitúrico es representativo de la circulación plasmática de hidroperóxidos lipídicos en mujeres con preeclampsia. La hipertensión inducida por el embarazo se ha asociado con una sobreproducción de peróxidos lipídicos y una disminución de la defensa antioxidante (*Pyska W et al, 2002*).

Por lo tanto, la presencia de un estrés oxidativo puede ser el punto en el cual convergen múltiples factores resultantes en la disfunción endotelial y las subsiguientes manifestaciones de la eclampsia. Este estrés oxidativo puede tener un papel importante en la disfunción endotelial de la preeclampsia al disminuir la disponibilidad de óxido nítrico que constituye el principal vasodilatador endotelio dependiente (*Myatt L et al, 1996*).

La xantina oxidasa, es una importante fuente de superóxido y existen publicaciones que informan sobre un aumento de la enzima en las vellosidades placentarias invasoras de pacientes con preeclampsia (*Many A et al, 1996*).

La vitamina C o ascorbato en plasma disminuye gradualmente a lo largo del embarazo normal. Este fenómeno se acentúa aún más en la preeclampsia según las publicaciones de dos artículos (*Bilodeau JF et al, 2003*). En forma opuesta, la vitamina E plasmática aumenta durante una gestación normal. Esto podría deberse al aumento gestacional de las lipoproteínas circulantes que son las transportadoras naturales de vitamina E en sangre. Pero en las pacientes con preeclampsia se pueden encontrar concentraciones de vitamina E significativamente menores a las observadas en pacientes sanas, y a las observadas en pacientes con hipertensión arterial crónica no complicada durante el embarazo (*Gratacos E, Casals E, Deulofeu R et al, 2003*). De esto se puede concluir que el aumento del estrés oxidativo en el feto de la paciente preeclamptica está más relacionado con la fisiopatología de ésta última que con la hipertensión crónica (*Little RE, Gladen BC, 1999*).

Diferentes estudios han encontrado una asociación entre la suplementación con vitaminas antioxidantes y una reducción en la incidencia de preeclampsia en mujeres con cierto riesgo de presentar esta enfermedad (*Bilodeau JF et al, 2003; Chappell LC et al, 2002; Lyell DJ et al, 2003*).

### **E. Rotura prematura de membranas.**

La rotura prematura de membranas ovulares (RPM) se define como la solución de continuidad espontánea de la membrana corioamniótica antes del inicio del trabajo de parto. La RPM puede ocurrir en cualquier momento de la gestación, pero se asocia a mayor morbilidad cuando ocurre en el embarazo de pretérmino. Representa la condición asociada aproximadamente un tercio de los partos prematuros.

La etiología de la RPM es desconocida en la mayoría de los casos. Sin embargo, se han identificado varias condiciones predisponentes:

Algunos autores han asociado la peroxidación lipídica con la rotura prematura de las membranas amnióticas, como desencadenante directo o bien como factor relacionado con enfermedades causadas por rotura prematura de membranas (*Yin B, 1995*).

Recientes estudios han encontrado que la NADPH oxidasa, enzima generadora de especies reactivas de oxígeno, se encuentre activada en corionamnionitis (CAM). Temma K y col. estudiaron el efecto de 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), el cual es un marcador de estrés oxidativo, sobre placenta humana durante el parto pretérmino y encontraron que los niveles de proteínas modificadas por HNE estaban aumentadas en las placentas con CAM comparadas con placentas de los casos normales (*Temma K, Shimoya K, Zhang Q et al, 2004*).

El ácido hipocloroso (OHCL) es un factor potencial de ruptura prematura pretérmino de membranas (RPPM), y hasta ahora es considerado la ERO predominante. Este ácido formado por neutrófilos, activado por exposición a bacteria o complemento, libera mieloperoxidasa. En presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se forma un compuesto que, a través de la cloronización, genera OHCL. Se ha demostrado que el OHCL inicia la peroxidación lipídica de lipoproteínas y lisosomas fosfolípidos. La filtración de OHCL dentro de la matriz mantenida por

los neutrófilos adyacentes al corioamnios, en respuesta subclínica a las bacterias, podría adelgazar la membrana fetal. Se ha demostrado que el ácido hipocloroso estimula la liberación de procolagenasa e inhibe la actividad de tejido inhibitorio de metaloproteinasa, acontecimientos que podrían resultar en daño del colágeno en el corioamnios (*Woods JR jr, 2001*).

En resumen la bibliografía indica que la RPM podría resultar de un daño del epitelio amniótico o del colágeno en el corioamnios, inducido por las ERO. Esta hipótesis está apoyada por:

a) estudios epidemiológicos que enlazan condiciones clínicas conocidas que producen las ERO o reducen la protección antioxidante a la RPPM;

b) estudios *in vitro* en los que los segmentos de membrana expuestos a ERO exhiben alteraciones tisulares consistentes con RPPM, y

c) estudios clínicos que evidencian que las muestras del corioamnios y del líquido amniótico obtenido de pacientes con RPPM exhiben excesiva degradación del colágeno.

El papel del antioxidante para proteger el corioamnios del daño de las ERO es sugerido por un estudio reciente *in vitro* (*Woods JR jr, 2001*).

## **F. Diabetes gestacional.**

Numerosos autores afirman que las madres con diabetes mellitus o con diabetes gestacional inducen estrés oxidativo a sus hijos (*Biri A et al, 2006; Chaudhari L et al, 2003; Chen X, Scholl TO, 2005*), probablemente no sólo por un aumento de los radicales libres, sino también por un daño en los mecanismos de defensa antioxidante. Algunos autores, incluso han apuntado la necesidad de medir este estrés oxidativo en las pacientes diabéticas con el fin de prevenir las complicaciones en la clínica, así como la necesidad de la suplementación con antioxidantes (*Peuchant E et al, 2004*).

La teratogenicidad de la diabetes gestacional se ha visto relacionada con el estrés oxidativo en el embrión, donde la extensión del daño se puede reducir aparentemente con los antioxidantes (*Zaken V et al, 2001*).

Se ha podido demostrar una disminución en la actividad de la enzima superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa en embriones de rata cultivados en medios con altas concentraciones de glucosa y cuerpos cetónicos, al igual que una disminución de vitaminas C y E en estos embriones. Cuando se adiciona a los medios de cultivo diabéticos estas vitaminas se revierte completamente todos los cambios producidos por la diabetes, aumentando las concentraciones de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa y catalasa, y disminuyendo la peroxidación lipídica embrionaria; mientras que si se las adicionamos a embriones normales, no se observa ningún cambio (*Zaken V et al, 2001*). A nivel genético, se ha observado que disminuye el ARM-m que codifica la superóxido dismutasa, debido a una hibridación resultante del efecto directo de factores metabólicos diabéticos sobre el genoma de la superóxido dismutasa y que se revierten al adicionar a los medios de cultivo vitaminas C y E (*Zaken V et al, 2001*).

El ácido úrico aumenta durante el estrés oxidativo y el daño celular, especialmente durante la necrosis celular, se ha observado un aumento de ácido úrico en los embriones cultivados en condiciones diabéticas, lo que podría explicarse por el aumento de la apoptosis (*Zaken V et al, 2001*). Las altas concentraciones de ácido úrico también pueden actuar como un prooxidante ya que pueden disminuir el reciclado redox del  $\alpha$ -tocoferol, y aumentar la peroxidación lipídica, esto es otro punto adicional a los mecanismos de daño embrionario causados por la diabetes.

El estrés oxidativo inducido por la diabetes gestacional se manifiesta como un aumento de productos de la peroxidación lipídica y con un daño oxidativo en las proteínas eritrocitarias tanto maternas como fetales, que se han utilizado como indicadores eritrocitarios de la actividad de los radicales libres del oxígeno en la diabetes gestacional. Las concentraciones de malodialdehído son altas en los hijos de los pacientes con diabetes gestacional, y tienen una relación directa y significativa con los niveles de hemoglobina glicosilada (*Kamath U et al, 1998*).

### 2.2.2.- Neonato

En la edad pediátrica cada vez son más los hallazgos significativos en los que se implica al estrés oxidativo como fuente de daño en mayor o menor grado. De hecho, ya el recién nacido está expuesto a un mayor grado de estrés oxidativo, debido a su inmadurez orgánica y al cambio brusco de concentración de oxígeno, de un medio como el útero, pobre en dicho gas en comparación con el aire ambiente (*Ferriero DM, 2001*). No obstante, los neonatos a término cuentan con mecanismos de protección más adecuados frente a los efectos de los radicales oxigenados libres que los adultos o los prematuros, debido a un mayor nivel, fundamentalmente a nivel plasmático, de antioxidantes, como la bilirrubina, y a un menor contenido en lípidos oxidables (*Fewtrell MS et al, 2002*). Éstos últimos deben soportar un grado de estrés oxidativo mayor que los nacidos a término, y con un sistema antioxidante, como ya se ha citado, inmaduro aún (*Fily A et al, 2006*). A su vez, el nivel de estrés en los pretérminos aumenta cuando éstos se ven sometidos a procesos que motiven hipoxia, frente a prematuros libres de la misma (*Finer NN et al, 2006*).

Esta mayor exposición del prematuro a la acción de los radicales libres derivados del oxígeno (*Flamant C, Lorino E, Nolent P et al, 2007*) motiva una participación de éstos en procesos como la broncodisplasia pulmonar, la retinopatía de la prematuridad, el daño hepatocelular o la fibroplasia retrolental (*Fogel I et al, 2005*), así como en la hemorragia intraventricular de los pretérminos. El ya citado mayor grado de hiperoxia ha motivado la reciente propuesta de reanimar a los neonatos que precisen bolsa autoinflable con aire ambiente.

Tabla 20. Patologías en las que se implican los radicales libres, en mayor o menor grado.

- **Enfermedades inflamatorias:** Artritis reumatoidea; enfermedad inflamatoria intestinal; Pancreatitis.
- **Medicina intensiva:** Traumatismos; sepsis; hipoxia; hipoperfusión orgánica
- **Patología pulmonar:** SDRA y neonatal; fibrosis pulmonar idiopática; fibrosis quística.
- **Patología ocular:** Fibroplasia retrolental; degeneración macular; cataratas
- **Enfermedades hematológicas.**
- **Ejercicio.**
- **Toxicidad por drogas y fármacos:** ej. Paracetamol, valproato.
- **Diabetes.**
- **Transplantes.**
- **Hipertensión.**
- **Cáncer.**
- **Envejecimiento.**
- **Aterosclerosis**

No obstante, como bien reflejan Donough et al en su reciente artículo de revisión, el concepto de la falta de preparación del prematuro para combatir el estrés oxidativo se basa fundamentalmente en la experimentación con animales. En seres humanos pretérminos sin embargo, aún son escasos los estudios que relacionen directamente el desarrollo ontogénico y la expresión de las enzimas antioxidantes en los distintos tejidos.

Entre los mecanismos de protección frente a la hiperoxia que se ponen en marcha en el período perinatal se encuentra el incremento de enzimas antioxidantes (*Figura 13*), cuyo crecimiento sigue una curva similar a la del surfactante pulmonar. Frank y cols. sugieren como explicación a este crecimiento el incremento progresivo y endógeno de los sustratos oxigenados para estas enzimas (*Frank L et al, 1996*). Se ha demostrado una mayor concentración de hidroperóxidos, un menor nivel de alfa-tocoferol y una menor actividad de la SOD y GPX en citosol en recién nacidos pretérmino en relación

en relación a recién nacidos a término (Ochoa JJ et al, 2003). También se ha observado un incremento progresivo de la peroxidación lipídica (Figura 13) y del índice glutacion oxidado/glutacion reducido (Frank L et al, 1996). La maduración prenatal de los sistemas antioxidantes no es simultánea en todos los órganos y sistemas, siendo más precoz en corazón, seguido pulmón, por último, riñón, lo que explicaría la mayor vulnerabilidad de éste último al estrés oxidativo. En los partos prematuros no se produce este proceso preparatorio, lo que, añadido a la mayor susceptibilidad al daño producido por radicales libres, predispone a estos pacientes a una mayor incidencia de patologías como la displasia broncopulmonar.

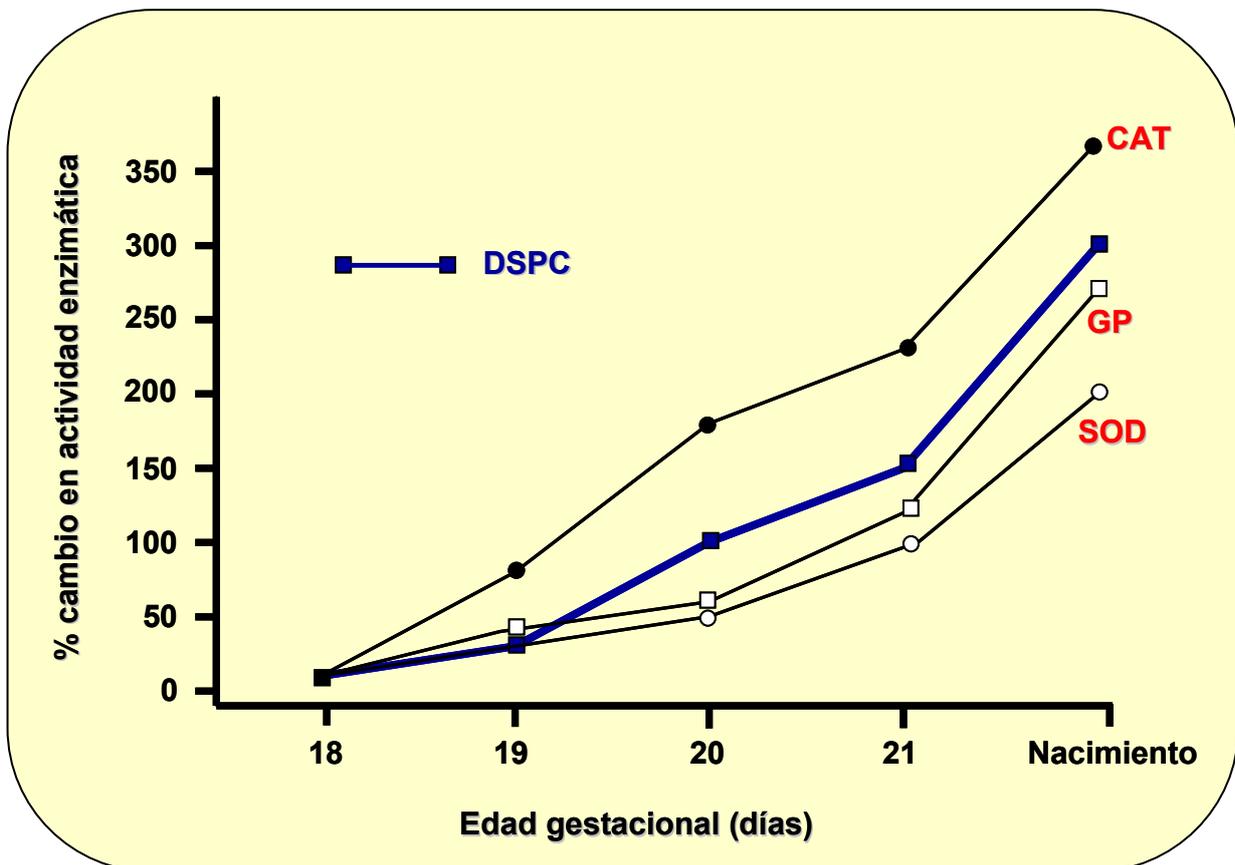


Figura 13.- Cambios al final de la gestación en la concentración de Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa (CAT) y glutationperoxidasa (GP). En línea gruesa se indica la maduración del sistema de surfactante.

Fuente: Frank L. Clinics in Perinatology. Bronchopulmonary dysplasia.1987;19:541-562

### **2.2.2.1.- Adaptación postnatal a la hiperoxia**

*Se ha demostrado una mayor adaptación de los animales a término a la transición a ambiente hiperóxico, por lo que soportan comparativamente mejor el daño pulmonar inducido por aquél que los animales adultos. Así, experimentos con ratas recién nacidas han mostrado una supervivencia del 100% de las mismas tras 72 horas de exposición a ambiente hiperóxico, frente a una supervivencia de sólo un 20% en ratas adultas. También se ponía de manifiesto una respuesta adaptativa significativamente menor en partos prematuros (Torbati D et al, 1993). En tejido pulmonar de fetos humanos y en el de ratas a término, expuestos a concentraciones de oxígeno del 100%, se han detectado incrementos significativos del glutathion total, a expensas del glutathion reducido, con un aumento concomitante de otras enzimas con capacidad antioxidante como la glucosa-6-fosfato-deshidrogenasa, la glutathion reductasa y la glutathion peroxidasa (Warshaw JB, 1985).*

En el SNC, la capacidad de respuesta frente a la hiperoxia se relaciona tanto con la fisiología del cerebro como con las características químicas del mismo en esta etapa de inmadurez funcional y estructural, como son el bajo flujo sanguíneo, la escasa concentración de PUFAs y una menor tasa metabólica energética. Frente a todo esto, en mamíferos adultos el principal mecanismo protector lo constituye la vasoconstricción cerebral transitoria. En las ratas recién nacidas se han detectado dos elementos de defensa asociados: vasoconstricción del SNC y disminución de la ventilación de manera persistente (Molina A et al, 2002), con objeto de recuperar el esquema de intercambio gaseoso propio de la vida fetal.

### **2.2.2.2.- Capacidad antioxidante en el período neonatal**

Se ha demostrado una correlación significativa entre la actividad antioxidante en cordón umbilical de neonatos prematuros y su peso al nacimiento (Sullivan JL, 1988). Se piensa que la incapacidad antioxidante que presentan estos pacientes podría relacionarse con la patología por toxicidad del

oxígeno. Sin embargo, otros estudios no encuentran diferencias estadísticamente significativas entre la madurez fetal y la actividad de algunas enzimas antioxidantes, como la SOD eritrocitaria (*Ripalda MJ et al, 1989*).

Como ya se ha citado anteriormente, existen dos sistemas de defensa antioxidante frente al estrés oxidativo, el primario, compuesto por la SOD, la catalasa, y las enzimas del ciclo redox del glutatión, en tanto que el sistema secundario de defensa lo constituyen diversas sustancias (*Winterbourn CC, 1995*). Ambos sistemas tienen como misión la retirada de las especies reactivas del oxígeno y otros hidroperóxidos generados durante el metabolismo normal. Se trata de un conjunto de reacciones enzimáticas fundamentalmente intracelulares, aunque se han observado también concentraciones de glutatión en el fluido alveolar que recubre el epitelio pulmonar hasta 100 veces superiores a las plasmáticas, además de la presencia de otros antioxidantes, como transferrina, ascorbato, ácido úrico y otros. A su vez, se ha puesto de manifiesto una menor presencia de glutatión alveolar en neonatos con enfermedad pulmonar crónica (*Litarru GP, 1994*).

El ácido úrico es un compuesto con capacidad antioxidante, protegiendo mediante neutralización del hipoclorito sódico sintetizado por los leucocitos, captación de hierro libre e inhibición de la producción de superóxido mediante la vía de la xantina oxidasa. En estudios longitudinales (a lo largo de las seis primeras semanas de vida) con prematuros se han puesto de manifiesto cambios importantes en la concentración plasmática de antioxidantes de primera línea: se produce un descenso de la concentración plasmática de vitamina C, ácido úrico y grupos sulfidrilo. En tanto que la concentración de vitamina E aumento de forma progresiva y la bilirrubina manifestó su comportamiento bimodal habitual. La capacidad de retirada de radicales peroxy (TRAP), in vitro descendió, en aparente correlación con los niveles descendientes de ácido úrico. En niños amamantados los niveles de TRAP fueron mayores (*Russel GAP, 1995*).

### 2.2.2.3.- Patologías relacionadas con los radicales libres en el período neonatal

#### a) Retinopatía del prematuro (ROP)

La retinopatía del prematuro (Fibroplasia Retrolental) es el desarrollo anormal de los vasos sanguíneos en la retina, comienza durante los primeros días de vida y puede progresar rápidamente causando ceguera en cuestión de semanas.

Sólo acontece en niños de muy bajo peso al nacer cuyos vasos retinianos no han completado su desarrollo centrífugo a partir del disco óptico (Bossi E, Koerner F, 1995). Los factores implicados en su desarrollo son muy variados, aunque la edad gestacional y la intensidad y duración de la exposición a oxigenoterapia parecen ser los factores más determinantes para su desarrollo (**Tabla 21**).

**Tabla 21. Principales factores relacionados con la patogénesis de la retinopatía de la prematuridad.**

FACTORES ETIOLÓGICOS
- Grado de prematuridad
- Hiperoxia
- Hipoxia
- Duración de la oxigenoterapia
- Apnea
- Sepsis
- Transfusiones
- Persistencia del ductus
- Hiper/hipocarbica
- Luz
- Acidosis láctica
- Radicales de oxígeno
- Déficit de Vitamina E

Existen algunas evidencias de que la retinopatía del prematuro es consecuencia de un elevado estrés oxidativo sobre la retina en desarrollo, lo cual se debe a la generación exagerada de radicales libres o a una disminución en la capacidad para su eliminación (Cervantes-Munguía R, 2006). Concretamente, existe una asociación entre la concentración elevada de lipoperóxidos séricos, como una medida de estrés oxidativo y la incidencia de esta enfermedad.

La **Tabla 22** recoge la incidencia de Fibroplasia retrolental en función del grado de prematuridad, según datos de Bossi y cols (Bossi E, Koerner F, 1995)

**Tabla 22. Porcentaje de ROP en función de la edad gestacional (8)**

E.G. (semanas)	24-27	28-31	32-35
Global (%)	40-89	19-63	0-28
Estadios 3	12-29	2-20	0-3.5

La retina es un tejido neural rico en oxígeno, mitocondrias y PUFAs. Su tasa de consumo de oxígeno es muy elevada, mayor que cualquier otro órgano o tejido. Esta tasa de metabolismo del O<sub>2</sub> genera radicales libres que causan lipoperoxidación de las membranas ricas en PUFAs, dañando la función retiniana. Al déficit de protección antioxidante motivado por la prematuridad se añade el habitual déficit nutricional. En estos casos, la falta de magnesio y/o cobre genera un aumento de la síntesis de tromboxano A<sub>2</sub>, dando lugar a vasoconstricción, con la consiguiente isquemia retiniana y proliferación reactiva de la vasculatura de la retina (Reedy EA, 2004).

Para la prevención de esta patología se han promovido diversas actuaciones. La monitorización continua de la tensión de oxígeno de los pretérminos no ha reducido su incidencia. La administración de vitamina E, con función antioxidante sí parece eficaz (Reedy EA, 2004), aunque aún faltan datos que avalen su eficacia y su inocuidad. Se ha señalado el papel protector

de la bilirrubina en esta patología, por su papel antioxidante, aunque para otros autores la capacidad antioxidante de la misma es mínima (*Reedy EA, 2004*)

### **b) Displasia broncopulmonar (DBP)**

La causa de esta enfermedad es multifactorial, habiéndose implicado factores como la hipoxia, la inmadurez pulmonar, el barotrauma, la infección y la inflamación, entre otras. También se implica la ventilación mecánica con elevadas presiones y el tratamiento con oxígeno a altas concentraciones de forma prolongada. La toxicidad del oxígeno inspirado a concentraciones elevadas produce lesión directa en las barreras endoteliales y epiteliales, y produce edema pulmonar (*Jackson RM, 1985*). Se produce una secuencia de procesos y cambios morfológicos durante el aporte de oxígeno a elevadas concentraciones: a) fase exudativa, durante los primeros días; b) fase proliferativa, a la semana aproximadamente, en la que los neumocitos tipo I son sustituidos por los neumocitos tipo II; c) fase de remodelación pulmonar. En algunos estudios se ha demostrado, por otro lado, la eficacia protectora de la SOD frente al estrés producido por la hiperoxia a nivel pulmonar, aunque su papel como preventivo del desarrollo de futuras complicaciones pulmonares en estos pacientes es actualmente controvertido (*Suresh GK et al, 2001*).

Los hallazgos de laboratorio son muy similares a los encontrados en modelos experimentales de toxicidad pulmonar por oxígeno, por lo que se ha implicado en su patogénesis a los radicales libres (*Kelly FJ, Lubec G, 2001*). Entre los efectos tóxicos pulmonares mediados o producidos por los radicales libres se incluyen: inhibición de la síntesis de surfactante, citotoxicidad sobre las células endoteliales, epiteliales y sobre los macrófagos alveolares, inhibición de la respuesta vascular pulmonar frente a la hipoxia, inhibición de los mecanismos de reparación pulmonar mediados por los fibroblastos, que motiva alteraciones en la ubicación del colágeno y desarrollo pulmonar anómalo (*Kelly FJ, Lubec G, 2001*).

### Susceptibilidad al desarrollo de DBP:

La causa por la que la DBP, en iguales condiciones, afecta a unos prematuros y a otros no se desconoce. Sí se sabe que a menor peso y edad gestacional las probabilidades de desarrollarla son mayores, entre otros aspectos por la inmadurez de los mecanismos antioxidantes. De hecho, varios estudios han mostrado entre otros aspectos, la escasa actividad de los sistemas antielastasa y antiproteolítico (Davis JM, 2002), así como la baja concentración de lactoferrina (Figura 14) y lisozima (Figura 15), las dos proteínas más abundantes en el fluido alveolar epitelial con actividad protectora de la mucosa alveolar en niños con DBP. La inmadurez de estas glándulas submucosas contribuye pues al desarrollo de DBP (Revenis ME, 1992).

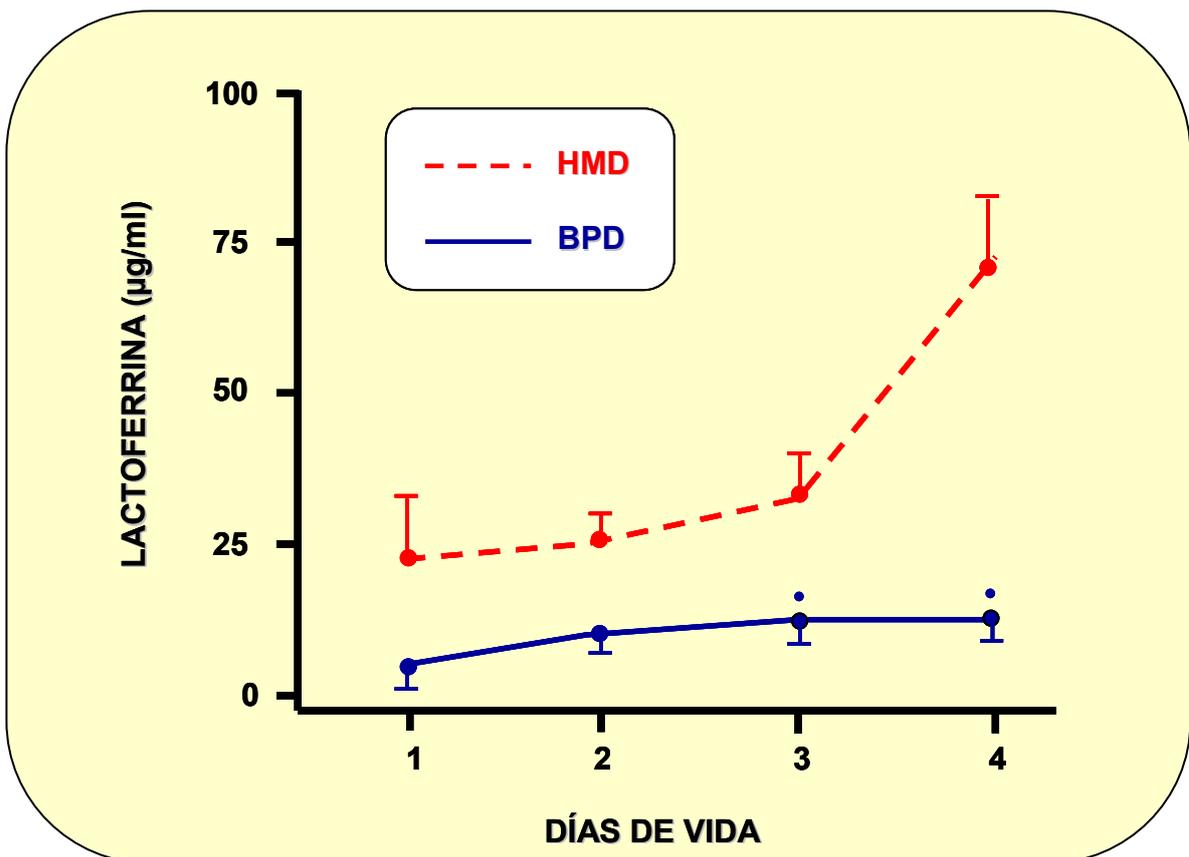


Figura 14. Concentración de lactoferrina en aspirado traqueal procedente de un grupo de lactantes con enfermedad de membranas hialinas (HMD) y otro grupo de lactantes con broncodisplasia pulmonar (BDP). \* $p < 0,005$  mediante el test U de Mann-Whitney, con comparaciones posteriores mediante el método de Bonferroni. (Revenis y cols. J. Pediatrics 1992;121:262-270).

Otros factores implicados en la génesis de la DBP son:

A) La infección connatal, concretamente la colonización materna por ureaplasma urealyticum y multitud de procesos infecciosos que sufren los pretérminos, motivan entre otros aspectos un aumento de las células inflamatorias (fundamentalmente neutrófilos) a nivel alveolar (Pierce MR, 1995), lo que conllevaría un aumento de radicales libres procedentes del oxígeno.

B) Elevada proporción de hierro libre (Mak IT, Weglicki WB, 1994).

C) Frecuentes episodios de apnea con isquemia, con elevada producción de superóxido y radicales hidroxilo tras la reperfusión (Molina A et al, 2001)

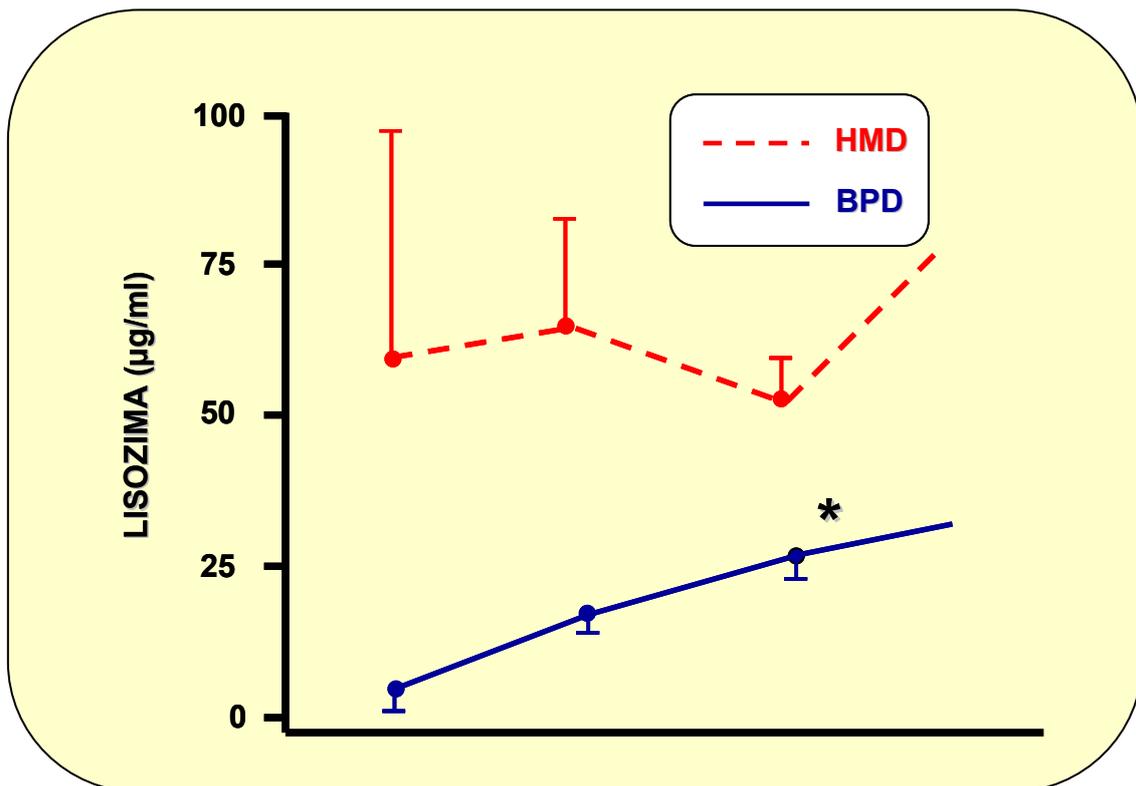


Figura 15.- Concentración de lisozima en aspirado traqueal procedente de un grupo de lactantes con enfermedad de membranas hialinas (HMD) y otro grupo con displasia broncopulmonar (DBP). \* $p < 0,05$  mediante el test U de Mann-Whitney, con comparaciones posteriores mediante el método de Bonferroni. La concentración de lisozima en niños con BDP leve-moderada fue significativamente superior en comparación con el grupo afectado de DBP severa (datos no representados aquí) (Revenis y cols. J. Pediatrics 1992;121:262-270).

El óxido nítrico (NO) es un compuesto con actividad antioxidante. Sin embargo, al reaccionar con radicales libres superóxido genera peroxinitrito, potente oxidante cuya presencia se ha demostrado tanto en tejido pulmonar de pacientes fallecidos por insuficiencia respiratoria como en ratas ventiladas con oxígeno al 100% (Molina A et al, 2001). Su unión a Thioles produce nitrothioles, con lo que se evita el daño que supone, sin embargo el prematuro es deficiente en el thiol más abundante a nivel pulmonar, el glutatión. Parece claro, no obstante, que en ausencia de superóxido el óxido nítrico no presenta actividad prooxidante (Molina A et al, 2001)

Los radicales libres desnaturalizan enzimas citosólicas, incluyendo el inhibidor de la proteasa  $\alpha_1$ , cuya función es la de proteger los pulmones y las proteínas que conforman el surfactante de las proteínas presentes en los neutrófilos (Orvig, C, 1995). También desnaturalizan proteínas y DNA, e inician la peroxidación lipídica, con lo que se produce un daño en las membranas celulares y la inactivación del surfactante. Estas reacciones pueden ser cuantificadas ya que dejan marcadores que permiten valorar el grado de estrés oxidativo, entre los que se encuentran los hidroperóxidos, endoperóxidos, aldehídos productos finales del malonildialdehído, etano y pentano (tras la oxidación lipídica), carbonilos proteicos (tras la afectación de proteínas ) y 8-hidroxideoxiguanosina (OH8DG) cuando se afecta el DNA.

### **c) Fenilcetonuria**

La fenilcetonuria es un trastorno autosómico recesivo causado por una deficiencia en el sistema de hidroxilación de la fenilalanina, caracterizándose por un bloqueo en la conversión de fenilalanina a tirosina. Los trabajos de Martínez-Cruz et al. en ratas muestran cómo la fenilcetonuria induce un estado de estrés oxidativo que de alguna manera se relaciona con el daño cerebral y en el resto de órganos y aparatos que conlleva este error innato del metabolismo. Asimismo, dichos autores subrayan la capacidad de la melatonina y otros antioxidantes de prevenir dicho daño (Martínez-Cruz F et al, 2002)

#### **d) Hipertensión pulmonar persistente neonatal**

En la fisiopatología de este proceso la implicación de los radicales libres también ha sido puesta de manifiesto. Así, en cerdos se ha comprobado que el sistema hipoxantina-xantinoxidasa provoca vasoconstricción pulmonar, que es inhibida tras la administración de alopurinol, indometacina o catalasa (*Wang, Z et al, 1995*).

#### **e) Persistencia del ductus arterioso**

En modelos experimentales, concentraciones fisiológicas de hipoxantina, en presencia de xantino-oxidasa, provocan la apertura del ductus, con aumento concomitante de la concentración de PGE<sub>2</sub>, en tanto que la indometacina y la catalasa inhiben tanto la producción de prostaglandinas como la apertura del ductus. De todo esto puede deducirse la capacidad dilatadora del ductus por parte de los radicales libres, posiblemente porque induzcan la producción de prostaglandinas en la pared ductal (*Clyman RI, 1989*).

#### **f) Enterocolitis necrotizante (ECN)**

Se trata, como los anteriores, de un proceso de etiología multifactorial, en el que la acción de los radicales libres ha sido puesta de manifiesto (*Fitzgibbons SC et al, 2009*). Existen dos fuentes de radicales libres en el intestino isquémico: la xantino-oxidasa y los fagocitos, activados en parte por la actividad de los radicales libres, con el consiguiente daño al colágeno y la membrana mucosa basal, lo que conlleva un aumento de la permeabilidad capilar, edema, degeneración y daño celular y finalmente necrosis. En intestino delgado la concentración de xantino-oxidasa es muy elevada. La ECN acontece cuando los factores precipitantes (hipoxia, hipotermia, infección...) se han resuelto, o lo que es lo mismo, cuando se produce la reperfusión de los tejidos isquémicos, con la consiguiente hiperproducción de radicales libres a partir del anión superóxido (*Raboei EH, 2009*). En animales adultos los

metabolitos reactivos del oxígeno intermedian en la permeabilidad microvascular y de la mucosa intestinal que ocurre tras la reperfusión del intestino isquémico (*Zani A et al, 2008*).

También se ha relacionado la peroxidación lipídica en la patogenia de la NEC, ya que en modelos experimentales de ECN los niveles de malonildialdehído en homogeneizado de tejido intestinal son muy superiores a los presentes en el grupo control. En este modelo, la vitamina E ejerce un efecto protector (*Henry MC, Moss LR, 2008; Carter BM, Holditch-Davis D, 2008*)

### **g) Encefalopatía hipóxico-isquémica**

Los períodos de hipoxia neonatal, aun siendo breves en cuanto a su duración o moderados en su intensidad, se relacionan con importantes alteraciones en la perfusión cerebral, lo que puede dar lugar a lesiones celulares, motivadas entre otros aspectos por la acumulación de radicales libres. En cultivos de neuronas de ratas recién nacidas se detectó un aumento de radicales libres dependientes del óxido nítrico en el grupo sometido a hipoxia; así mismo, el nivel de radicales libres descendía de manera estadísticamente significativa en los cultivos pretratados con SOD (*Singh SK et al, 1999*). De otro lado, en cerdos neonatos expuestos a hipoxia se pone de manifiesto una alteración tras repercusión postisquemia en la reactividad microvascular, debida a los aniones superóxido y sus metabolitos (*Gulcan H et al, 2005*). Sin embargo, a nivel cerebral no parecen influir en la alteración de la vasodilatación (*Zhou BY et al, 2008*).

La acidosis secundaria al proceso isquémico produce liberación de hierro por parte de la transferrina, lo que facilita la síntesis de radicales libres que a su vez liberan más hierro procedente de la ferritina (*Sharda B, 2006*). El descenso de actividad tanto en la SOD como de catalasa a nivel hemático ha sido puesto de manifiesto tanto en neonatos con hipoxia aguda como crónica (*Buchmann EJ, Velaphi SC, 2009*).

### 3.- PAPEL DE LA LECHE MATERNA EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE DEL RECIEN NACIDO

El estrés oxidativo tiende a ocurrir en el periodo neonatal debido a que mientras menos es la edad gestacional, menor es la capacidad antioxidante (CA) y una menor CA tiende a incrementar los radicales libres (RL) y las especies reactivas de oxígeno (ERO) (*Robles R. Palomino N, Robles A, 2001*)

El daño celular debido al estrés oxidativo durante el periodo neonatal ha sido asociado con algunas enfermedades (*Saugstad OD, 1996*). Por citar algún ejemplo, se ha asociado con:

- Enterocolitis necrotizante, si la zona dañada esta en el tracto digestivo (*Zhou Y et al, 2005*)
- Enfermedad pulmonar crónica, si dicha zona está en los pulmones (*Schock BC et al, 2001*)
- Retinopatía del prematuro (ROP), si lo está en los ojos (*Papp A, 1999*)
- Leucomalacia periventricular (LPV) si está en el cerebro (*Inder TE, Volpe JJ, 2000*)
- Hemorragia intraventricular (HIV) también si está en el cerebro (*Volpe JJ, 1997*)

Saber como evitar el estrés oxidativo es un importante factor para mejorar el diagnóstico o la prognosis. En términos generales, hay dos caminos para prevenir el estrés oxidativo. Uno sería evitar los factores que desencadenan la producción de radicales libres (RL) y especies reactivas de oxígeno (ERO). El otro sería reforzar o fortalecer la capacidad antioxidante que protege nuestro organismo del daño celular, atenuando los RL y las EROs cuando éstas incrementan.

Un estudio acerca de los factores que previenen la producción de RL y EROs consiguió demostrar que usando un 21% de oxígeno en lugar del 100% durante la reanimación podría mantenerse el estrés oxidativo a unos niveles

muy bajos, ya que este causaría un aumento de ambos (RL y EROs) (*Vento M et al, 2003*)

Además, varios estudios sobre el fortalecimiento de la capacidad antioxidante han investigado la administración oral de antioxidantes (vitaminas A, E y D), pero dichos estudios no han alcanzado un consenso en cuanto a conclusiones (*Delvin EE et al, 2005; Raju TN et al, 1997; Darlow BA et al, 2005; Johnson L et al, 1982*)

La leche materna es un alimento que incluye antioxidantes. Aunque es una conclusión basada en estudios de corta duración, se sabe que la leche humana tiene mayor capacidad antioxidante que las fórmulas infantiles (*Hanna N et al, 2004; Turolí D. et al, 2004*). La lactancia materna ha demostrado ser clínicamente importante en comparación con dichas fórmulas. Por ejemplo, comparando las cohortes de ambas leches, se obtiene que la materna muestra una reducción de 1/10 en el riesgo de ECN (*Lucas A, Cole T, 1990*), mejor desarrollo neurológico (*Vohr BR et al, 2006*) y una disminución del desarrollo de retinopatía del prematuro (*Hylander MA, 2001*).

No obstante, y como ya se ha dicho, hasta el momento no hay resultados concluyentes en estudios a largo plazo de la capacidad antioxidante total en leche materna.

### **III.- MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **1.- PRODUCTOS QUÍMICOS UTILIZADOS**

Los reactivos y solventes utilizados en las determinaciones analíticas fueron suministrados por los laboratorios MERCK (Darmstadt, Alemania), FLUKA (St. Louis, MO, USA), SIGMA (St. Louis, MO, USA), PANREAC (Barcelona, España) y BOEHRINGER (Manheim, Alemania). Los solventes de calidad HPLC procedieron de los laboratorios Merck.

Los patrones para la determinación del perfil lipídico fueron suministrados por Sigma y Fluka. Los homólogos de CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> fueron suministrados por PHARMITALIA (Milan, Italia).

#### **2.- APARATOS DE USO GENERAL**

Aunque algunos de los equipos serán descritos junto con la descripción de la técnica, dado su mayor complejidad. A continuación se describen los aparatos más comunes y de uso generalizado en muchas de las técnicas realizadas.

- Agitador de microplacas Shaker PSU2T Plus. BOECO (Alemania).
- Agitador magnético con calefactor AGIMATIC-E. JP-SELECTA, S.A (Barcelona, España).
- Balanza digital GRAM PRECISION (Gram Precision, SL. Barcelona, España).
- Balanza electrónica de precisión SARTORIUS BP110S (Sartorius AG, Göttingen, Alemania).

- Baño seco digital (LABNET INTERNATIONAL, Inc. Woodbridge, NJ, EEUU).
- Baño termostatzado de metacrilato P-SELECTA (JP-Selecta, SA. Barcelona, España).
- Centrífuga refrigerada de mesa BECKMAN mod GS-6R (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, EEUU).
- Congelador de -20°C LIEBHER (LIEBHER, Biberach, Alemania).
- Congelador de -80°C REVCO (REVCO, Asheville, NC, EEUU).
- Estufa MEMMERT (Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Alemania)
- Lector de microplacas SYNERGY HT, Multi-Dection Microplate Reader, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- Máquina productora de hielo SCOTSMAN AF-10 (Scotsman Ice Systems, Vernon Hills, IL, EEUU).
- Microcentrífuga para eppendorfs HETTICH EBA12 ZENTRIFUGEN (HettichLab GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Alemania).
- Micropipetas electrónicas EPPENDORF RESEARCH® PRO. EPPENDORF AG (Hamburgo, Alemania).
- pH-metro GLP 21, CRISON (Barcelona, España).
- Pipetas automáticas NICHIPET EX (Nichiryo, Tokio, Japón).
- Vortex VWR (VWR International Eurolab S.L. Barcelona, España).

### 3.- SOFTWARE ESPECÍFICOS.

- Gene Five para lector de microplacas SYNERGY HT, BIO-TEK (BioTek Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, EEUU).
- SPSS 15.0 para Windows.
- System Gold® HPLC (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU).
- Software del cromatógrafo

### 4.- GRUPOS EXPERIMENTALES

Para llevar a cabo el estudio se han seleccionado un total de 36 madres lactantes sanas en la maternidad del hospital universitario “Virgen de las Nieves” de Granada, de las que 30 completaron el estudio en el periodo comprendido entre 2003 y 2004, y se agruparon según el tipo de parto en:

Grupo **Término**: 15 madres lactantes sanas que presentaron un parto eutócico a término.

Grupo **Pretérmino**: 15 madres lactantes sanas que presentaron un parto eutócico prematuro.

Las características de las madres se muestran en la siguiente tabla, observándose que salvo para la variable correspondiente a las semanas de gestación, no mostraron diferencias significativas ni en el índice de masa corporal (IMC), edad o paridad.

Tabla 23.- Características de las madres objeto de estudio

	<b>Grupo pretérmino</b>	<b>Grupo a término</b>
	<b>(n = 15)</b>	<b>(n = 15)</b>
<b>Tiempo de entrega (wk)</b>	32 ± 1	39 ± 1*
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	26.1 ± 0.4	25.7 ± 0.5
<b>Edad (años)</b>	30.1 ± 6.3	29.8 ± 4.9
<b>Paridad</b>	1.8 ± 1	1.9 ± 0.7

Los resultados se muestran como la media ± desviación estandar. \* Grupo pretermino vs. Grupo a termino ( $P < 0.05$ ).

Como factores incluyentes se utilizaron en este estudio los siguientes:

- Embarazos sin patología detectable.
- Feto único y en presentación cefálica.
- Partos vaginales de terminación espontánea.
- Neonatos de peso adecuado para su edad gestacional.
- Recién nacidos vigorosos al primer y quinto minuto de vida.

Como factores de exclusión se utilizaron:

- Madres fumadoras.
- Madres que consumieron durante la gestación o después suplementos o cremas con vitaminas antioxidantes o coenzima Q.
- Todos los que no cumplan los criterios de inclusión antes reseñados.

## 5.- DISEÑO EXPERIMENTAL

A todas las madres se les dio una completa explicación del objetivo de este proyecto, para que pudieran firmar con pleno conocimiento el consentimiento escrito de participación.

Los lactantes fueron alimentados exclusivamente al pecho durante todo el estudio, y se establecieron contactos regulares con todas las madres durante el mismo periodo, prestándose ayuda en todo momento en la toma de muestras.

En cada uno de los grupos formados se realizaron tres tomas de leche materna a lo largo de la diversas etapas de la lactación: calostro (día 3 tras el parto), transición (día 6) y madura (día 30), tal y como se muestra en la figura del diseño experimental adjunto.

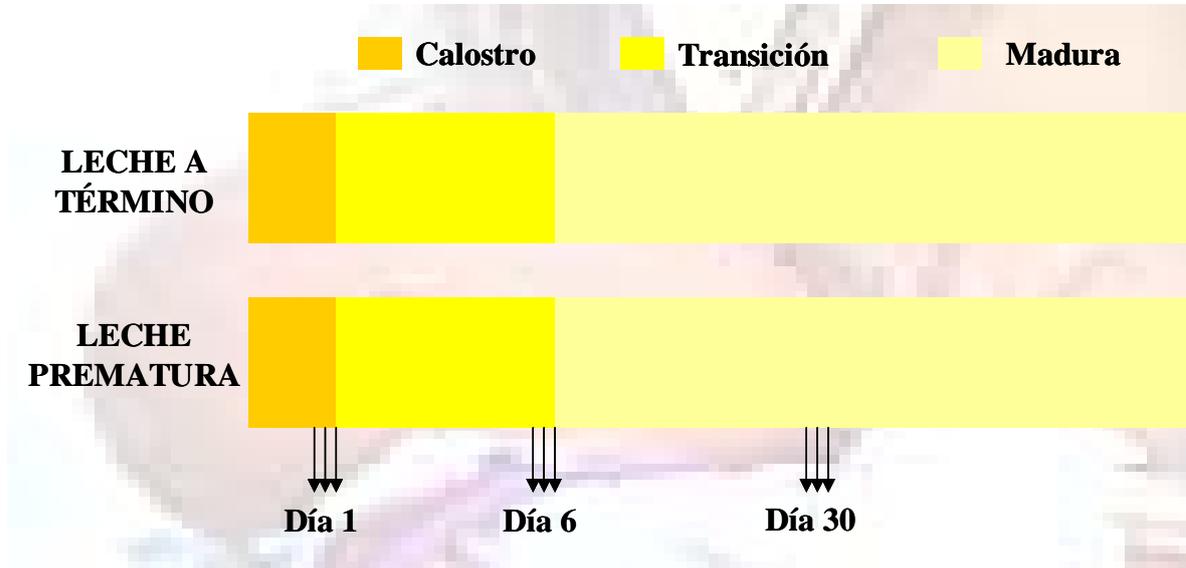


Figura 16.- Diseño experimental.

Por lo tanto en cada grupo se tomaron 45 muestras de leche: 15 muestras de calostro, 15 muestras de leche de transición y 15 muestras de leche madura.

## 6.- DATOS DIETÉTICOS DE LAS MADRES

La composición de la leche materna se ve influenciada por la alimentación de la madre, por lo que hemos creído conveniente estudiar la ingesta alimentaria de las madres para asegurar que las posibles diferencias entre leches de madre a término y leches de madre prematura sean debidas a la finalización normal o prematura de la gestación y no a otras variables. La ingesta dietética de las madres fue tomada en 4 días consecutivos (incluyendo un día de fin de semana) usando un recordatorio de ingesta alimentaria de 4 días rellenado en una consulta de pediatría, junto a la madre objeto del cuestionario. Estos cuestionarios se hicieron al principio y al final del estudio.

Al no haberse encontrado diferencias entre los periodos de inicio y final del estudio, se ha decidido mostrar únicamente los datos obtenidos en la encuesta de los primeros 4 días.

Los datos de ingesta energética, proteínas, grasa (separando saturada, monoinsaturada y poliinsaturada), colesterol, fibra y vitaminas A, C y E, han sido analizados con el programa **Nutrlber** (Mataix et al, 2005) desarrollado en el instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Granada, usando las tablas de composición de alimentos españoles (Mataix et al, 2004), que se incluyen a modo de aplicación en el mismo.

La ingesta de coenzima Q fue calculada usando algunas publicaciones previas del contenido de coenzima Q en alimentos (Kamei M et al, 1985; Mattila P, Kumpulainen J, 2001)

## **7.- TOMA DE MUESTRAS**

A todas las madres se les dieron instrucciones por escrito de cómo recoger las muestras, por la mañana y cada día a la misma hora. Estas instrucciones incluían la necesidad de realizar la extracción o recogida de la leche antes de la toma del desayuno, para evitar alteraciones debidas a la toma inmediata de dicha comida. Para ello usaron un sacaleches Medela Lactina Select eléctrico (Medela, USA) y el mismo se usó para la extracción de las tres muestras.

A continuación, tras la extracción de toda la toma, mezclaron con cuidado y suavidad y traspasaron 10 ml en un tubo de plástico. Dicha muestra fue rápidamente alicuotada en tubos eppendorf de 1 ml y congelada a -80°C hasta su posterior análisis. Todas las muestras, además, estuvieron en todo momento preservadas y protegidas de la luz.

## **8.- DETERMINACIONES REALIZADAS**

### **8.1.- Capacidad antioxidativa total**

La capacidad antioxidante total es una medida de todos los antioxidantes presentes en un líquido biológico (en este caso la leche), tales como vitaminas, sistemas antioxidantes de radicales enzimáticos, antioxidantes desconocidos y las interacciones antioxidantes. Se trata de un marcador sensible que permite detectar pequeñas diferencias mucho mejor que las mediciones de los antioxidantes por separado. La capacidad antioxidante se determinó por el método espectroscópico TEAC mejorado (*Trolox equivalent antioxidant capacity*). El método TEAC mejorado es un ensayo de decoloración que incluye todos los tipos de antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos y constituye una herramienta adecuada para evaluar el nivel oxidativo e identificar los

diferentes factores que lo afectan, como el hábito de fumar de la madre y la dieta.

Por este método se calcula el porcentaje de inhibición del catión radical 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS<sup>•+</sup>) (Re R et al, 1999) mediante el Trolox, un análogo soluble en agua del alfa-tocoferol (que es el antioxidante estándar) y un sistema de inyección de muestras (IF) tal como indican Bompadre et al (Bompadre et al, 2004).

El método está basado en la habilidad de las moléculas antioxidantes para apagar el ABTS<sup>•+</sup> de larga vida, un cromóforo azul-verdoso con características de absorción a 734 nm, en comparación al Trolox. La adición de antioxidantes al citado radical catión lo reduce a ABTS' produciendo una decoloración.

El sistema de inyección de muestras consiste en un Beckman System Golden 126 programable con modulo de disolvente con bomba, una válvula de inyección rheodyne equipada con un bucle de 5 µl, una bobina de reccion (0.8 mm i.d. x 1.58 mm o.d. x 120 cm) (Supelco) y un módulo de detección Beckman Sistem Gold 166 programable. El "flow" de la solución ABTS<sup>•+</sup> fue de 1.2 ml/min a temperatura ambiente. En pocas palabras, las soluciones standards Trolox (0.5 – 5 mM) se prepararon en etanol, y la solución ABTS<sup>•+</sup> con una solución almacenada obtenida por la reacción de una solución acuosa de ABTS con persulfato potásico 2.45 mM. La inyección directa de los standards y de las muestras de leche humana produjo un pico de decoloración teniendo un área proporcional a la pérdida de absorbancia de la solución de trabajo ABTS<sup>•+</sup>.

La cuantificación de la capacidad antioxidante total de la leche materna se realizó por comparación del área del pico de descoloración con la curva dosis-respuesta obtenida con los standards Trolox. Los resultados se expresan como valores de equivalentes con capacidad antioxidante y el TEAC se define como mmol de Trolox por litro de leche humana.

## 8.2.- Cuantificación de retinol, tocoferoles y coenzimas Q<sub>10</sub> y Q<sub>9</sub> mediante HPLC.

La determinación de estos antioxidantes en la leche materna fue llevada a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplada a un detector electroquímico coulométrico (HPLC-EQ) siguiendo el método de Battino y colaboradores (*Battino y col., 2004*). El sistema HPLC estaba compuesto por una bomba Beckman System Gold 125 (Beckman Instruments. Fullerton, CA, EEUU), un sistema automático de inyección de muestras Water 717 plus (Milford, MA, EEUU), una columna de acero inoxidable de 15cm de longitud y 4.6mm de diámetro interno relleno de una fase estacionaria ODS Supercosil de 3 $\mu$ m, un detector electroquímico ESA Coulochem III (ESA Biosciences, Inc. Chelmsford, MA, EEUU), una célula guarda modelo 5020 y una célula analítica modelo 5011 (ESA Biosciences, Inc. Chelmsford, MA, EEUU). La determinación se realizó manteniendo la columna a una temperatura constante de 22°C mediante el uso de un horno Peltier JetStream Plus (Thermotechnic Products GMBH .Langenzersdorf, Austria). Los cromatogramas fueron integrados usando el sistema System Gold Beckman (Beckman Instruments. Fullerton, CA, EEUU). La fase móvil consistía en una disolución de perclorato de litio 20mM, ácido perclórico 10mM, etanol al 20%, metanol al 80%, cuyo flujo era de 1ml/min; el electrodo 1 fue ajustado a -0.5V, mientras que el electrodo 2 lo estaba a +0.35V. De forma paralela, en la misma inyección y separación cromatográfica que para el coenzima Q, se analizaron retinol y tocoferoles ( $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ) usando el mismo sistema de HPLC acoplado a un sistema de detección de diodo array Beckman Diode array 168 (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, EEUU). El retinol se detectó a 325nm y el tocoferol a 292nm. La extracción se realizó a partir de 100 $\mu$ l de leche materna diluido en 300 $\mu$ l de 1-propanol. Tras la agitación vigorosa con vortex durante 60 segundos, se procedió a la centrifugación a 17870xg durante 5 minutos. Para la determinación cromatográfica se inyectaron 30 $\mu$ l de sobrenadante. El coenzima Q, retinol y los tocoferoles fueron identificados determinando los tiempos de retención de los estándares individuales y realizando una curva patrón.

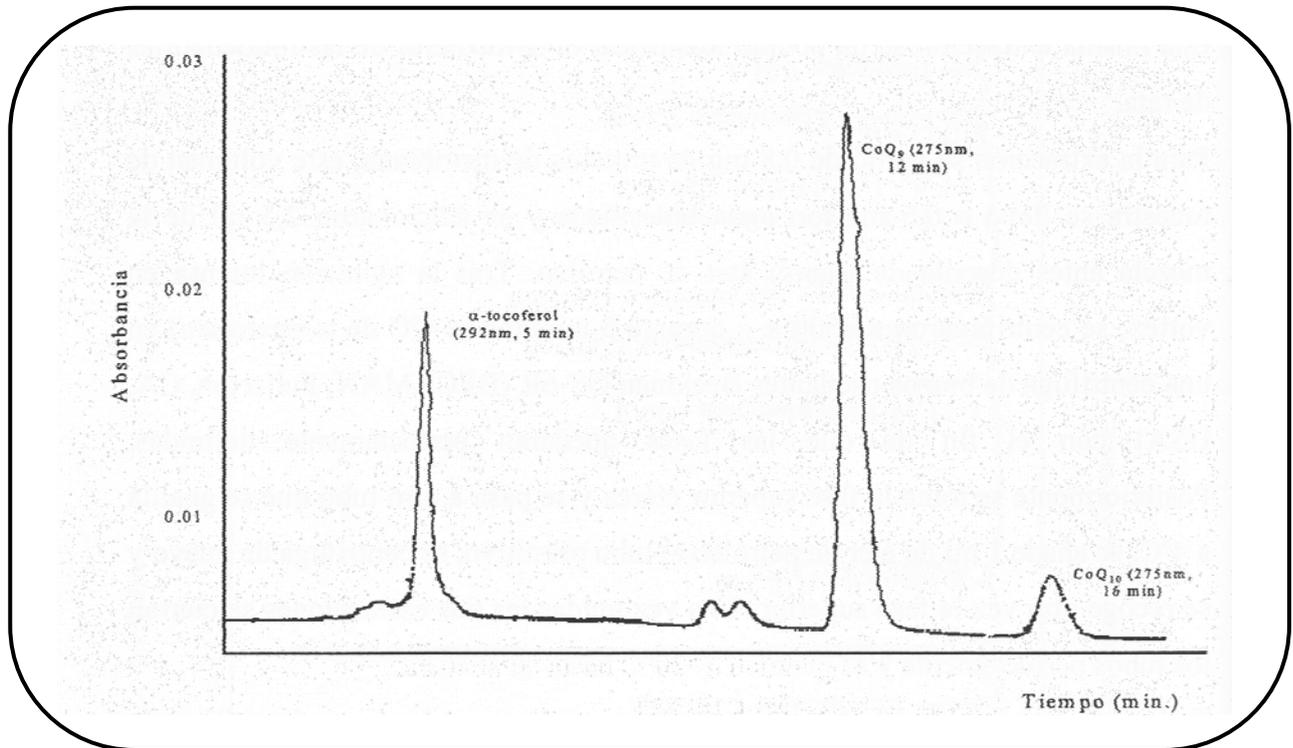


Figura 17.- Curva patrón de  $\alpha$ -tocoferol, CoQ<sub>9</sub> y CoQ<sub>10</sub> en HPLC

### 8.3.- Determinación de ácido úrico y ácido ascórbico mediante HPLC.

El ácido ascórbico y el ácido úrico fueron analizados por HPLC-EC con sistemas y columnas similares a los descritos en el apartado 8.2. La fase móvil se hizo de 10nM de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, pH 3 a 1 ml/min; el electrodo 1 fue puesto a -0,15 V, el electrodo 2 fue puesto a +0,35 V. Se mezclaron 10 microlitros de leche humana con 1 ml. de un **reagente?** de extracción (5% HPO<sub>3</sub> plus 10mM EDTA) agitado y centrifugado como se indicó anteriormente y se inyectaron 10  $\mu$ l de fase hidrosoluble en el HPLC. El ácido úrico y el ácido ascórbico se identificaron por por la determinación de los tiempos de retención en los standards individuales.

#### 8.4.- Determinación del perfil lipídico en leche materna

La técnica de *Lepage y Roy* (1986) fue utilizada para la determinación del perfil lipídico de las membranas mitocondriales que permite que se haga a la vez la metilación y la transesterificación de las muestras.

Se añaden 2ml de una mezcla de metanol:benceno (4:1) y 200  $\mu$ l de cloruro de acetilo en 100  $\mu$ l de muestra. Se procede a una agitación y se lleva al baño María a 100 °C durante una hora. Los tubos deben estar tapados para evitar la volatilización de su contenido. Se retiran los tubos y se espera su enfriamiento hasta que alcanzan la temperatura ambiente.

Se adicionan 2ml de solución de carbonato de potasio al 5% que actúa como un inhibidor, neutralizando la reacción, impidiendo que la reacción se siga procesando. En seguida se separan las fases mediante a centrifugación a 1756 x *g* (2500 rpm) durante 15 minutos. La fracción bencénica superior, conteniendo los lípidos, es extraída utilizándose una pipeta pasteur.

Se procede una evaporación por corriente de nitrógeno, de forma que la parte lipídica se queda atrapada en el fondo del tubo. Se resuspende en 50  $\mu$ l hexano y se inyecta 1 microlitro en el cromatógrafo de gases equipado con detector de ionización de llama. Se utilizó un cromatógrafo de gases modelo HP-5890 Series II (HEWLETT PACKARD, Palo alto, California; USA), equipado con detector de ionización de llama, columna capilar fused silica SP-2330 de 60 m de longitud, 0,32 mm de diámetro 0,2 $\mu$ m de espesor, inyector automático Hewlett Packard 7673 A y un integrador hewlett Packard 3393A.

La duración del proceso es de 40 minutos y se observa la siguiente curva de temperatura:

- 5 minutos a 160 °C;
- Incremento de temperatura de 6 °C/minuto hasta llegar a los 195 °C;
- 4 °C/minuto hasta los 220 °C;

- 2 °C/minuto hasta los 230 °C;
- 12 minutos en temperatura constante de 230 °C;
- Y reducción en la escala de 14 °C/minuto hasta los 160 °C;

Para la separación se utilizó una columna SP<sup>TM</sup> 2330 F.S (SUPELCO INC. BELLEFONTE, Palo Alto, California, EUA) de 60 metros de longitud 32 mm de i.d., y un grosor de 20mm. Se realizó una determinación cualitativa de lípidos de membrana y se expresaron los resultados como porcentaje en total de ácidos grasos detectados en el cromatograma.

El perfil de ácidos grasos de la leche humana se determinó por cromatografía gas-líquida como se describe en Lepage and Roy (24?) en un cromatografo Hewlett Packard HP 5890 Series II (Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA) usando una columna capilar de 60 mm de longitud, 32 mm id y 20 mm de grosor impregnada con Sp<sup>(TM)</sup> 2330 FS (Supelco Inc. Bellefonte, Palo Alto, CA, USA). Se pesaron 200 ml de leche humana de forma precisa en tubos de cristal y se disolvieron en 2 ml de metanol/benceno (4:1, v/v); se añadieron 100 µl del ácido graso 13:0 (0.4mg/dl) y 9µM de BHT a las muestras como standard interno y antioxidante, respectivamente. Para llevar a cabo la determinación cuantitativa de los diferentes ácidos grasos se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = ((A_x \cdot RF_x) / (A_{is} \cdot RF_{is})) C_{is} ;$$

**C = Concentración de un ácido graso concreto**

**A<sub>x</sub> = Área obtenida en el cromatógrafo para ácido graso concreto**

**RF<sub>x</sub> = Factor respuesta**

**A<sub>is</sub> = Área para el standard interno de la muestra**

**RF<sub>is</sub> = Factor respuesta**

**C<sub>is</sub> = Concentración del standard interno**

### 8.5.- Determinación de colesterol

El colesterol se ha determinado mediante la utilización de un kit comercial SPINREACT (SPINREACT, S.A., Girona, España), adaptado para la aplicación de un lector de microplacas SYNERGY HT, Multi-Dection Microplate Reader, (BIO-TEK® Instruments Inc. Vermont, EEUU). Tanto las muestras, como los patrones y blancos, se prepararon por duplicado. Al tratarse de muestras de leche y según indicaciones de la casa comercial se ha procedido previamente a la extracción de colesterol de las muestras mediante saponificación con una solución metabólica de 0.5 M de KOH, tal y como indica Fletorius et al, (1998).

Se adiciono la muestra al pocillo, al igual que el patrón primario acuoso de colesterol (200mg/dl), se añadieron 100µl de reactivo (Colesterol esterasa 300 U/L, Colesterol oxidasa 300 U/L, Peroxidasa 1250 U/L, 4-Aminofenazona 0.4 mM, Fenol 26 mM y PIPES 90 mM pH 6.9) tanto a muestras como patrón y blanco (reactivo), la mezcla se agitó incubó a 37°C durante 5 minutos; acto seguido, se leyó la absorbancia del patrón y la muestra frente al blanco a 505nm. La intensidad del color que se forma es proporcional a la concentración de colesterol que tenemos en la muestra a evaluar.

### 8.6.- Determinación de minerales

La concentración de calcio, hierro, cobre, magnesio y zinc en la leche materna se ha llevado a cabo mediante espectrofotometría de absorción atómica. Para esta determinaciones se ha usado un Espectrofotómetro de Absorción Atómica Perkin-Elmer (U.S.A.) Modelo Aanalist30. Tanto el Ca como el Mg requieren del empleo de cloruro de lantano al 1% como inhibidor de interferencias. Para la determinación de los diferentes elementos se emplearon lámparas específicas de cátodo hueco.

La determinación de fosforo se realizó mediante espectrofotometría (espectrofotómetro UV/V Modelo Uvikon-XS). Para determinación de fosfatos

se utiliza el método de Fiske-Subbarow que emplea el molibdato amónico como reactivo colorimétrico.

Para las determinaciones mediante absorción atómica se procedió a la mineralización por vía húmeda, adicionándole a la muestra 2 mL de ácido nítrico (65%) y 2 mL de ácido perclórico (60%) (Merck, Germany). Una vez frías las disoluciones se les añade 1 mL de clorhídrico 5N y se diluye la disolución enrasando hasta 10 mL con agua bidestilada. Todas las determinaciones se realizaron previo control de calidad a partir de curva patrón específica para cada mineral así como con analíticas repetidas (4 veces) del Material de Referencia para cada uno de ellos (>95%). Los patrones empleados son todos provenientes de la casa Perkin Elmer (USA).

Todo el material empleado para las determinaciones se mantuvo 24h en NO<sub>3</sub>H al 2% (v/v) y enjuagados con agua bidestilada para evitar contaminación.

El Material de Referencia empleado para el control de calidad es BCR 063R Milk Powder (Community Bureau of Reference, Bruselas, Bélgica). Las concentraciones certificadas y obtenidas de los diferentes elementos analizados en el material de referencia de polvo de leche BCR 063R\* son mostradas en la tabla siguiente.

**Tabla 23.- Concentraciones certificadas y obtenidas de los diferentes elementos analizados en el material de referencia de polvo de leche BCR 063R\***

<b>ELEMENTO</b>	<b>CONCENTRACION ENCONTRADA</b>	<b>CONCENTRACION CERTIFICADA</b>
Ca	15.20 mg/g ± 0.06	13.49mg/g ± 0.10
Fe	8.354 mg/g ± 0.08	8.220 mg/g ± 0.09
Mg	1.231 mg/g ± 0.032	1.236mg/g ± 0.024
Na	45.56 mg/g ± 0.30	55.32 mg/g ± 0.24
K	53.34 mg/g ± 0.40	48.40 mg/g ± 0.50
Se	35.00 µg/g ± 0.60	38.00 µg/g ± 0.55
Cu	1.270 mg/g ± 0.05	1.290 mg/g ± 0.05
Zn	1.210 mg/g ± 0.07	1.100 mg/g ± 0.06
P	18.25 mg/g ± 0.12	18.50 mg/g ± 0.10

\* Los resultados son los referidos a las Medias y las Desviaciones Estándar de 10 replicas independientes del patrón de referencia

## **9.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO**

Los resultados obtenidos se muestran como la media  $\pm$  error estándar de la media y con un n igual a 15.

Para cada grupo, las medias entre tomas de muestras se compararon usando contrastes ajustados por medidas repetidas ANOVA y corrección de Bonferroni.

Las medias entre grupos para cada tipo de leche fueron comparadas usando el test de la t de Student.

La significación estadística se estableció a  $P < 0,05$ , y los datos fueron analizados con SPSS versión 15 (*SPSS Inc., Chicago, IL, USA*)

#### IV.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 36 madres que comenzaron el estudio lo completaron un 85% (30 madres). El seguimiento de la dieta tal como se indica al principio de un estudio de este tipo se denomina adherencia (*Sofi F et al, 2003*), y se define como la coincidencia entre la conducta del paciente y la orden del médico o especialista conductor del estudio (*del Corral P et al, 2009*).

La adherencia a los regímenes de tratamiento ha sido estudiada ampliamente, sobre todo en lo que tienen que ver con el comportamiento de las personas (*Benfari RC et al, 1981; Homedes N, Ugalde A, 1994*) y el grado de incumplimiento suele oscilar en este tipo de estudios entre el 10 y el 25%.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el índice de masa corporal, edad o paridad entre los dos grupos de mujeres que lo completaron, como indica la **Tabla 24**.

**TABLA 24.- Características fundamentales de las madres lactantes<sup>1</sup>**

	Grupo pretérmino (n = 15)	Grupo a término (n = 15)
Tiempo de entrega (wk)	32 ± 1	39 ± 1*
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	26.1 ± 0.4	25.7 ± 0.5
Edad (años)	30.1 ± 6.3	29.8 ± 4.9
<b>Paridad</b>	1.8 ± 1	1.9 ± 0.7

<sup>1</sup> Media ± Desviación estandar.

\* Grupo pretermino vs. Grupo a termino ( $P < 0.05$ ).

La ingesta de nutrientes se calculó como la media para los 4 días encuestados (**Tabla 25**)

**TABLA 25.- Ingesta diaria estimada en las madres lactantes<sup>1</sup>**

	Grupo pretermino (n = 15)	Grupo a término (n = 15)
<b>Energía (kJ)</b>	11344 ± 1228	10224 ± 1232
<b>Energía (kcal)</b>	2714 ± 294	2446 ± 334
<b>Carbohidratos (g)</b>	395.7 ± 56.5	285.2 ± 80.4
<b>Proteínas (g)</b>	114.6 ± 13.1	103.4 ± 15.4
<b>Grasa (g)</b>	113.9 ± 18.1	103.8 ± 22.2
<b>Saturada (g)</b>	27.5 ± 6.9	25.1 ± 5.6
<b>Monoinsaturada (g)</b>	52.9 ± 8.8	48.2 ± 10.2
<b>Poliinsaturada (g)</b>	15.2 ± 2.1	13.9 ± 2.5
<b>Colesterol (mg)</b>	422.6 ± 124.2	399.9 ± 138.1
<b>Fibra (g)</b>	19.3 ± 6.2	19.9 ± 5.4
<b>Vitamina A (ER)</b>	1012.1 ± 415.7	996.6 ± 395.5
<b>Vitamina C (mg)</b>	154.9 ± 81.4	148.3 ± 91.9
<b>Vitamina E (mg)</b>	6.1 ± 2.4	6.1 ± 0.9
<b>Coenzima Q (mg)</b>	3.2 ± 1.1	2.7 ± 1.1

<sup>1</sup> Media ± Desviación estándar.

ER: Equivalentes de retinol.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la ingesta de energía, carbohidratos, proteína, grasa (incluyendo los distintos tipos de ácidos grasos y el colesterol), fibra, vitaminas A, C o E y conzima Q.

Como se puede observar en la tabla 25, las ingestas totales de energía fueron de  $2714 \pm 294$  Kcal para el grupo pretérmino, y de  $2446 \pm 334$  kcal para el grupo a término, lo que se asemeja bastante a las recomendaciones energéticas para madres lactantes, que rondan las 2700-2800 kcal (Mataix J, Lopez-Frías M, 2009).

Las cantidades recomendadas para la mujer lactante comparativamente a no lactante, españolas y estadounidenses, se indican en la **Tabla 26**.

**Tabla 26.- Ingestas recomendadas de energía y nutrientes para España y EEUU.**

	Energía (kcal)	Proteína (g)	Vitaminas liposolubles					Vitaminas hidrosolubles					Minerales							
			A Eq retinol	D (µg)	E (mg α tocoferol)	K (µg)	C (mg)	B <sub>1</sub> (mg)	B <sub>2</sub> (mg)	Niacina (mg Eq niacina)	B <sub>6</sub> (mg)	Folato (µg)	B <sub>12</sub> (µg)	Calcio (mg)	Fósforo (mg)	Magnesio (mg)	Hierro (mg)	Cinc (mg)	Iodo (µg)	Selenio (µg)
<b>España</b>																				
Mujer no lactante	2.300	41	800	5	12	-	60	0,9	1,4	15	1,6	200	2	800	-	330	18	15	110	-
Mujer lactante (*)	+500	+25	+500	+5	+5	-	+25	+0,2	+0,3	+3	+1,5	+100	+0,6	+700	-	+120	18	+10	+45	-
<b>Estados Unidos</b>																				
Mujer no lactante	2.200	50	700	5	15	90	75	1,1	1,1	14	1,3	400	2,4	1.000	700	320	18	8	150	5
Mujer lactante (*)																				
1 <sup>er</sup> semestre	+500	+25	+600	5	+4	90	+45	+0,3	+0,5	+3	+0,7	+100	+0,4	1.000	700	320	9	+4	+140	+15
2 <sup>o</sup> semestre	+500	+25	+600	5	+4	90	+45	+0,3	+0,5	+3	+0,7	+100	+0,4	1.000	700	320	9	+4	+140	+15

\*Las cantidades indicadas son suplementarias respecto de la mujer no lactante

Fuente: Mataix J, Lopez-Frías M. Lactación. En: Mataix J (Ed) Nutrición y Alimentación Humana. Ed Ergón, 2009

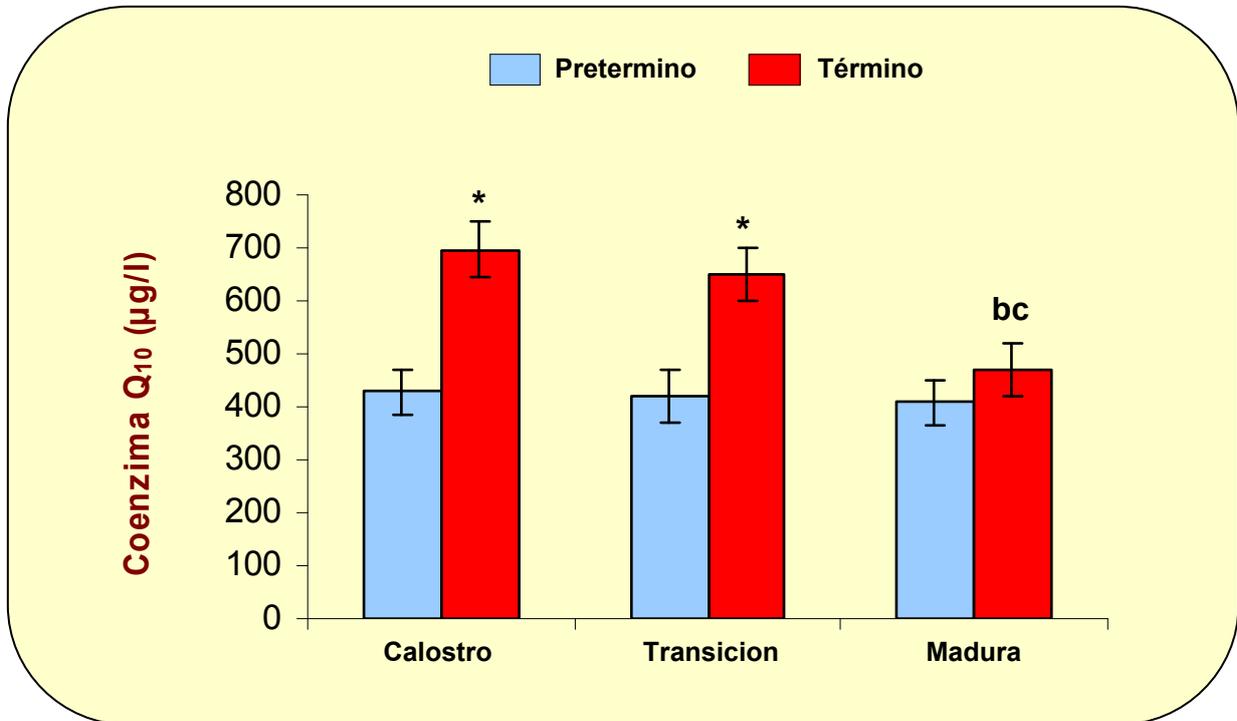
Las ingestas recomendadas para esta situación fisiológica se ven aumentadas así en 500 kcal respecto a las normales para sexo y edad.

La razón de esta energía adicional que requiere la madre lactante viene condicionada, sobre todo, por el coste energético de la lactación, la cual depende de la producción láctea media de 750 mL/día durante el primer semestre y 600 mL/día durante el segundo (Mataix J, Lopez-Frías M, 2009).

Se observa por tanto, que las madres objeto de estudio cumplían dichas recomendaciones.

**1.- Niveles de CoQ<sub>10</sub> en leche materna**

La **Figura 18** muestra el contenido en CoQ<sub>10</sub> de leche materna durante las tres etapas de lactación estudiadas (calostro, transición y madura), tanto en madres tras parto a término como pretérmino.



**Figura 18.-** Niveles de Coenzima Q<sub>10</sub> en leche materna a término y pretérmino en diferentes etapas de lactación (calostro, transición, y leche madura) media ± error estándar de la media

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro;

**c:** Leche madura vs. Leche de transición.

Los resultados muestran que las leches de madres a término presentan un mayor contenido en CoQ<sub>10</sub> en las dos primeras etapas de la lactación, calostro (media ± error estándar de la media de 697,1 ± 53,3 vs. 427,9 ± 42,9 µg/l) y transición (media ± error estándar de la media de 648,5 ± 50,4 vs. 420,5 ± 50,0 µg/l) en el grupo a término respecto al grupo pretérmino, disminuyendo este valor en la leche madura (media ± error estándar de la media de 468,3 ± 50,2 vs. 408,0 ± 42,5 µg/l).

Por el contrario, las leches de madres pretérmino no muestran variaciones estadísticamente significativas en el contenido de CoQ<sub>10</sub> a lo largo de la lactación, presentando en las tres etapas estudiadas valores similares a los encontrados en la leche a término madura, y por lo tanto inferiores (casi un 40%) a los encontrados en el calostro y leche de transición a término.

Estos resultados son de gran interés ya que muestran que durante las dos primeras etapas de la lactación, las cuales coinciden con los momentos de mayor estrés oxidativo para el recién nacido (*Ochoa JJ et al, 2007*), las leches procedentes de madres con partos a término presentan un mayor contenido en CoQ<sub>10</sub> (*Ochoa JJ et al, 2005*) Por lo tanto, esta leche cedería a los recién nacidos una mayor cantidad de este importante antioxidante liposoluble en los momentos en los que estos más lo necesitan. Por el contrario, y a pesar de presentar una mayor agresión oxidativa durante el parto y los primeros días de vida, los recién nacidos pretérmino obtendrían por parte de la leche materna un menor aporte de CoQ<sub>10</sub> y por lo tanto, una menor ayuda para su sistema de defensa antioxidante, al menos en cuanto a este antioxidante concreto.

Se ha descrito que el coenzima Q aumenta de manera importante desde el nacimiento a lo largo de los primeros 20 años de vida en humanos, para después descender de manera variable, de modo que en algunos tejidos, a los 80 años de edad, los niveles que se presentan son similares a los observados al nacimiento (*Quiles JL et al, 1999*). Otros estudios han investigado la variación asociada a la edad en las concentraciones plasmáticas de CoQ<sub>10</sub> y el estado redox en niños sanos (*Ramírez-Tortosa MC, 2008; Vennemann MM et al, 2009; Miles et al, 2004*) y han hallado que el CoQ y el ubiquinol no variaron entre niños y adultos de hasta 80 años de edad, por tanto los niveles observados aquí condicionarían los del niño, que son los que tendrían a los 80.

Por otra parte, estos resultados son los primeros en mostrar la presencia de CoQ<sub>10</sub> en leche materna, lo cual es de gran importancia a la hora de elaborar fórmulas infantiles, ya que como hemos comentado, estas deben de asemejarse lo más perfectamente posible a la leche a la que sustituyen.

## 2.- Niveles de tocoferoles en leche materna

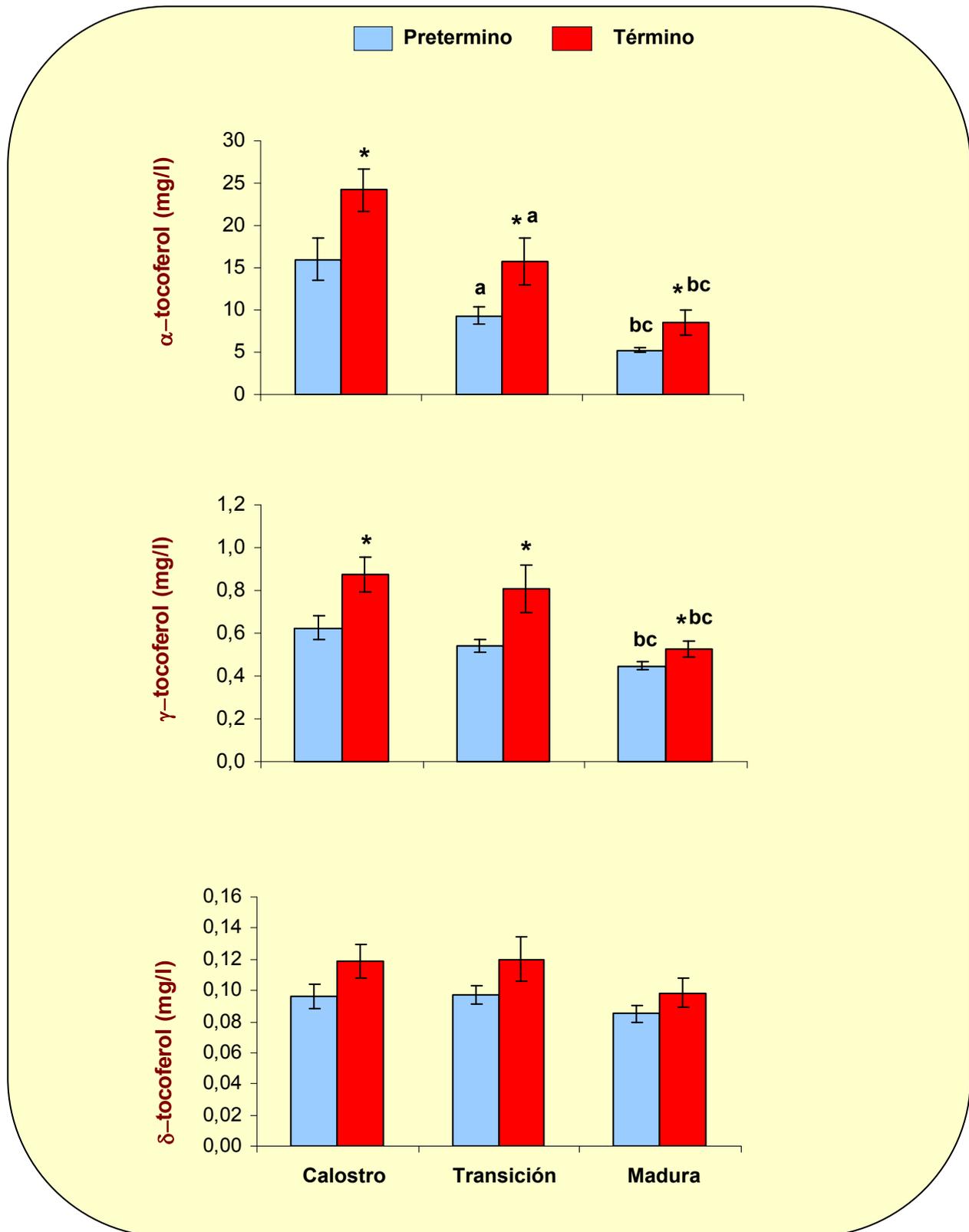
Se han estudiado los isómeros  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  - tocoferol (**Figura 19**).

Los isómeros  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol, los de mayor actividad biológica y antioxidante (*Ochoa JJ et al, 2007*), muestran un similar comportamiento, tanto en leches a término como pretérmino, en lo que respecta a su evolución con la madurez de la leche, presentando un mayor valor en el calostro y un menor valor en la leche madura. Sin embargo, existen diferencias entre estas leches, siendo las leches a término las que mayor cantidad de estas isoformas de la vitamina E presentan en las tres etapas de la lactación estudiadas.

En lo que respecta al isómero  $\delta$ -tocoferol, no se observa una diferencia estadísticamente significativa, ni entre grupos ni entre las distintas etapas de maduración de la leche, aunque parece tener una tendencia similar a la mostrada por los otros dos isómeros

Estos datos, junto al contenido en coenzima Q<sub>10</sub>, muestran que las leches procedentes de madres a término suministran a los recién nacidos un mayor contenido en antioxidantes liposolubles que las leches procedentes de madres pretérmino, sobre todo en las dos primeras etapas de la lactación, las cuales como hemos comentado coinciden con los momentos de mayor agresión oxidativa (*Ochoa JJ et al, 2003*).

Un dato característico en este sentido, es que este comportamiento de los antioxidantes liposolubles parece opuesto al mostrado por la grasa en la leche materna, ya que como veremos en la parte final, esta muestra una mayor presencia en la leche madura y un menor contenido en el calostro. Este hecho refuerza la importancia de la presencia de antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol en la leche materna en los primeros días de vida del recién nacido, es decir, cuando existe más estrés, ya que al ser sustancias liposolubles lo lógico es que mostraran un comportamiento similar al de la grasa.



**Figura 19.-** Niveles de  $\alpha$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -tocoferol en leche materna a término y pretérmino en diferentes etapas de la lactación (calostro, transición, y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro;

**c:** Leche madura vs. Leche de transición.

Debido a que el recién nacido, y particularmente el prematuro, es vulnerable a la deficiencia de vitamina E, y en vista de que no solo hay menos  $\alpha$ -tocoferol en la leche de los pretérmino, sino también en sangre y membrana eritrocitaria de estos niños (Ochoa JJ, 2007) se ha demostrado la utilidad de la suplementación dietética con  $\alpha$ -tocoferol, en la reducción de estrés oxidativo y prevención de fenómenos relacionados como el deterioro de la función mitocondrial (Rumbold A, Crowther CA, 2005; Straatman M et al, 2000).

Un importante factor en la regeneración del tocoferol es el ácido ascórbico (Lloyd JK, 1990). Tal vez sea por ello que, como luego veremos, los niveles del mismo tengan, como veremos posteriormente, un crecimiento inverso durante las tres etapas de la lactación estudiadas respecto al  $\alpha$ -tocoferol, hecho que podría acentuar dicha regeneración a medida que los niveles del mismo van bajando con el avance de la madurez de la leche.

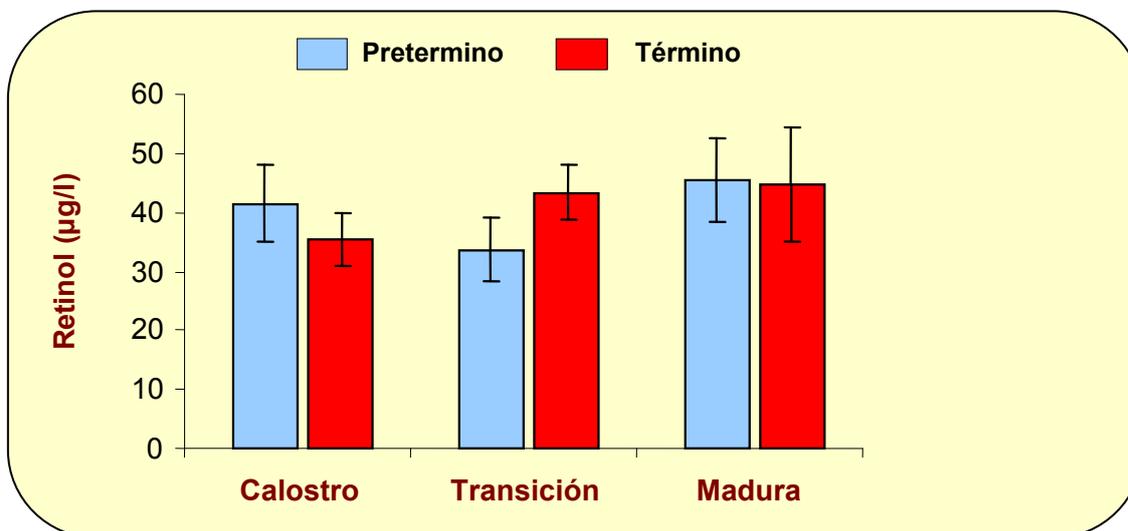
La media de los resultados de  $\alpha$ -tocoferol hallados en prematuros en este trabajo, es muy parecida al resultado reportado por Kaempf et al en 1994 sobre 28 neonatos, pero inferior a la informada por Gómez Vida et al en 1992 en el recién nacido pretermino y por Dison et al en 1993. Teniendo en cuenta que los equipos de detección usados en este estudio han sido bastante más modernos, los datos aportados aquí podrían ser más precisos.

En cuanto a la actividad biológica de las distintas isoformas de la vitamina E, el estándar se calcula a partir del  $\alpha$ -tocoferol, al ser el de mayor actividad biológica. El orden de actividad de los tocoferoles es  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  por lo general (Burton et al, 1994). Aunque no siempre coincide con la actividad biológica, la actividad antioxidante *in vivo* de los tocoferoles sigue el mismo orden  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$ . Esto podría justificar la mayor presencia de la isoforma  $\alpha$  en las leches estudiadas, dado la mayor demanda que podrían tener los recién nacidos, tanto a término como pretérmino de esta vitamina antioxidante por el mayor estrés oxidativo que sufren los días posteriores al nacimiento.

Por todo ello, los valores hallados de  $\alpha$ -tocoferol hacen que deba considerarse su posible aplicación en fórmulas infantiles.

### 3.- Niveles de retinol en leche materna

Los niveles de retinol en leche materna se observan en la **Figura 20**.



**Figura 20.-** Niveles de retinol en leche materna a término y pretérmino en diferentes etapas de la lactación (calostro, transición, y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición.

Como se puede apreciar, los niveles de retinol no muestran diferencias estadísticamente significativas ni entre leches a término y pretérmino, ni entre las distintas etapas de la lactación

Otros estudios, como el de *Newman V*, en 1993, muestran una cantidad de retinol doble en el calostro respecto a leche madura. También resalta que durante los primeros 6 meses el contenido equivalente de retinol (ER) de la leche tras una gestación a término en los países en vías de desarrollo es de tan solo 330 µg ER/l, en comparación con los 660 µg que se observaron en los países desarrollados, siendo aun mayor el contenido de las mujeres que presentaban un parto prematuro. Otros más recientes y usando métodos de detección más modernos (HPLC-EQ) como el de *Weinman et al* en 2007, muestran valores muy similares a los aquí mostrados (calostro 41,1 µg/l;

madura 42,6 µg/l). Debido a la moderna metodología de determinación, igual a la usada en la obtención de los resultados mostrados en la figura 20, podrían considerarse más precisos estos últimos resultados.

Tal como se dijo en antecedentes, el retinol interviene en el proceso de la visión y es necesario para el crecimiento normal, la reproducción, el desarrollo fetal y la respuesta inmunológica (*Portela MLPM de, 2003*).

Su concentración en la leche humana es variable, ya que depende de la ingesta materna, pero con una ingesta materna normal, los niveles de retinol en recién nacidos suelen ser normales también (*Canfield LM, 1995*).

Así, dado que las ingestas recomendadas para mujer gestantes y en periodo de lactancia son de 800 µg ER/día y 1.300 µg ER/día respectivamente, y que estas están dentro de los rangos mencionados al principio del apartado sobre ingesta diaria estimada de las madres objeto de estudio ( $1012.1 \pm 415.7$  para el grupo pretérmino y  $996.6 \pm 395.5$  para el grupo a término), podemos concluir que dichos valores están dentro de la normalidad

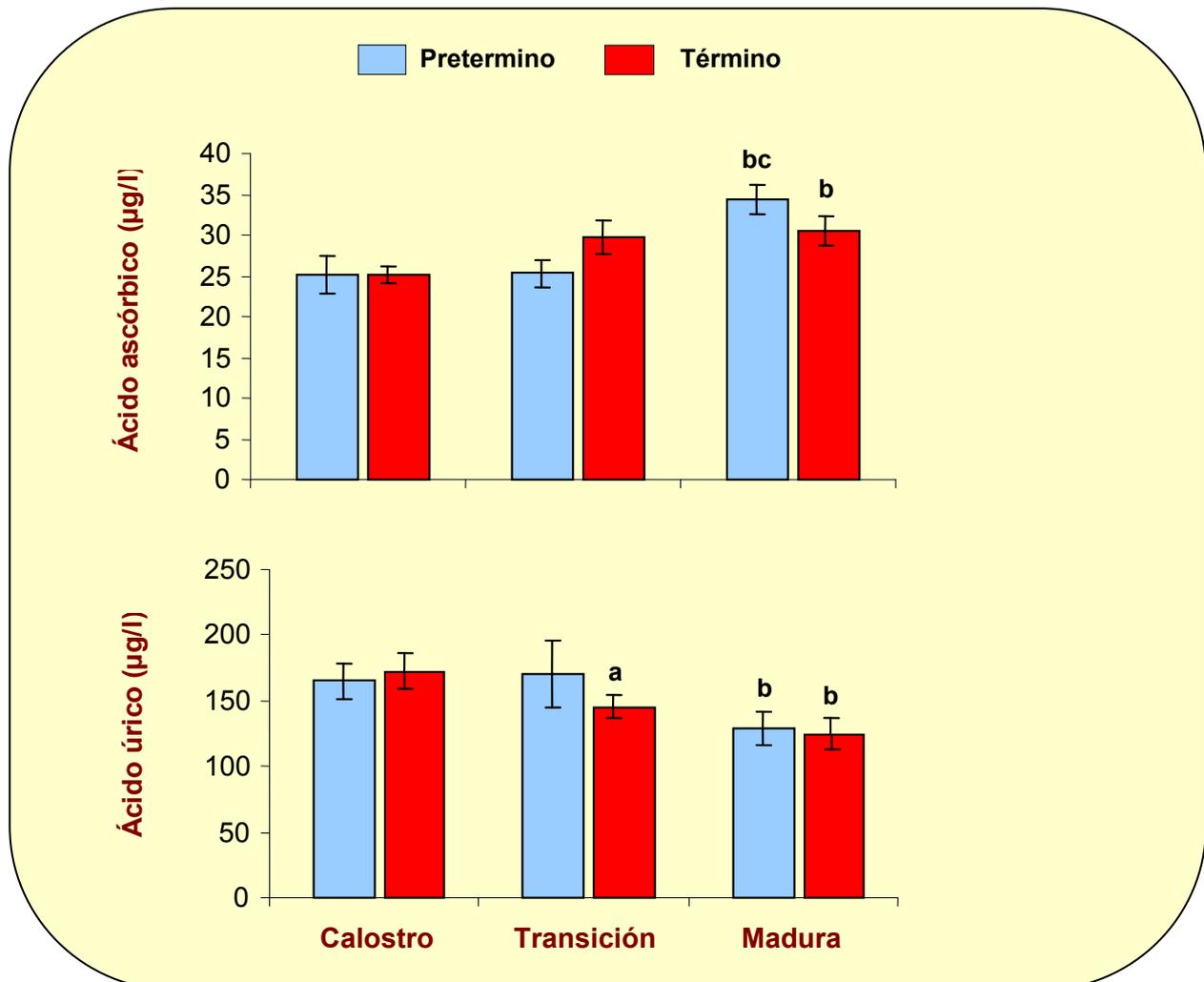
Es importante estar seguro de esto, ya que el retinol interviene también en el proceso de crecimiento de los tejidos, por lo que los niños en los primeros meses de vida, cuando la tasa de crecimiento es muy alta, deben tener asegurada esa cantidad suficiente de retinol.

Investigaciones realizadas en países pobres han puesto en evidencia una asociación entre la carencia de ésta vitamina y la mortalidad infantil por enfermedades infecciosas (*Humphrey, 2002; West, 1991*). En zonas de carencia extrema, la suplementación periódica con ella produce reducciones significativas de la mortalidad infantil (*Fawzi 1993; Rathmathullath, 1990*). Los grupos en mayor riesgo de presentar estados carenciales son las mujeres embarazadas o que están lactando a sus hijos y los niños en edad preescolar.

Aunque como se ha dicho la concentración de vitamina A de la leche materna procede de las reservas de la madre, la lactancia protege al niño de la deficiencia y ésta es rara entre los que lactaron (*Geene, 1991*).

#### 4.- Niveles de ácido ascórbico y ácido úrico en la leche materna

Los niveles de estos antioxidantes hidrosolubles son mostrados en la **Figura 21**.



**Figura 21.**- Niveles de ácido ascórbico y ácido úrico en leche materna a término y pretérmino.

( $P < 0.05$ ). Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro;

**c:** Leche madura vs. Leche de transición.

Estos antioxidantes no muestran diferencias estadísticamente significativas entre leches a término y pretérmino.

En lo que respecta a su evolución durante la lactación, muestran comportamientos opuestos. El ácido ascórbico presenta los máximos valores en leches maduras, mientras que el ácido úrico los muestra en el calostro.

Con solo los datos obtenidos en este estudio es difícil explicar este diferente comportamiento, aunque en referencia a los valores obtenidos de ácido úrico, podría tener algo que ver el hecho de que, como se indicó en la tabla 5 de los antecedentes bibliográficos, las proteínas totales sean significativamente mayores en el calostro, con un contenido 2,3 g que en la leche madura, con un contenido de tan solo 0,9 g (*Lawrence RA, 2007*)

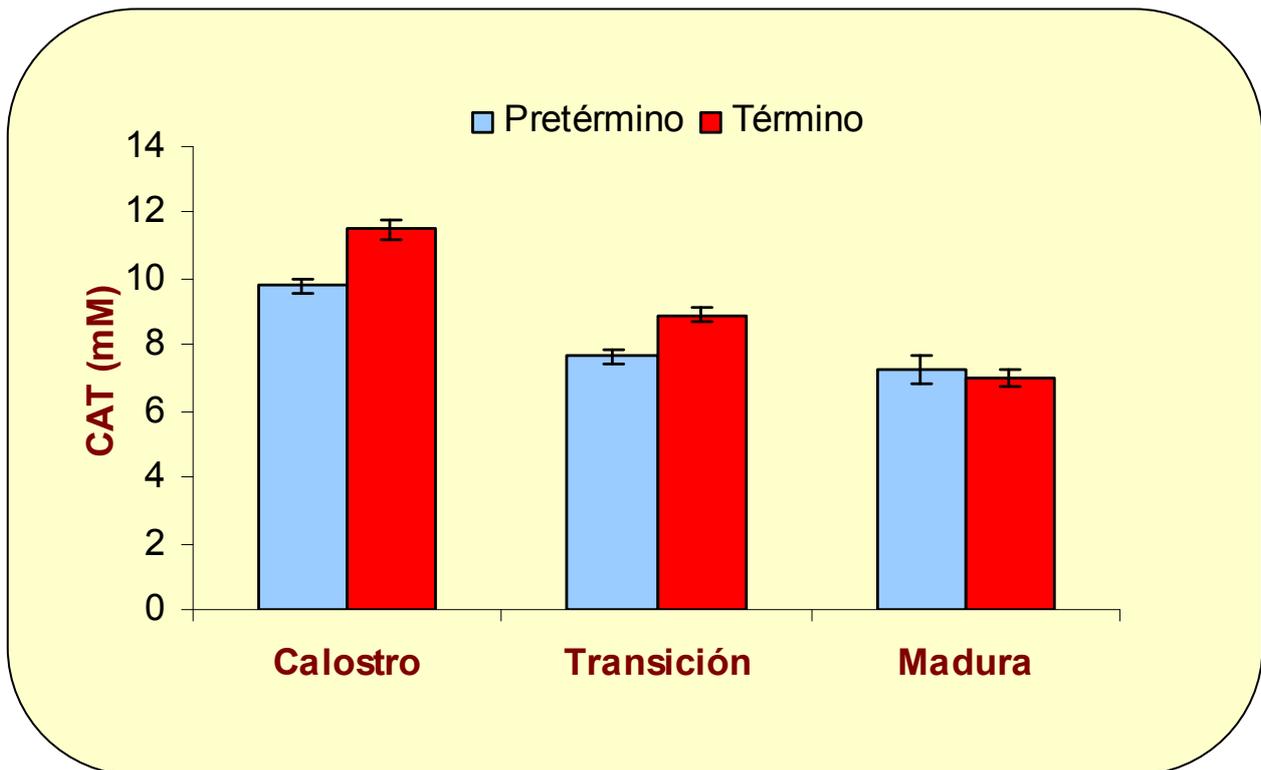
En cuanto al ácido ascórbico, es conveniente recordar que su evolución a lo largo de las distintas etapas de la lactación es inverso al mostrado por el  $\alpha$ -tocoferol. Se sabe que el ácido ascórbico es un importante factor en la regeneración del tocoferol oxidado (*Dai F et al, 2008; Nagaoka S et al, 2007; Kadoma Y et al, 2007*). Esto podría explicar, dada la gran actividad biológica de este antioxidante liposoluble, que los niveles de ácido ascórbico tengan dicho crecimiento inverso a través de las tres etapas de la lactación estudiadas respecto al del  $\alpha$ -tocoferol, acentuando su regeneración a medida que los niveles del mismo van bajando con el avance de la madurez de la leche materna.

Este hecho a su vez tendría otro efecto colateral, y es que los AGPI, que tanta importancia cobran en esta etapa de la vida como se mencionó en los antecedentes, tendrían menos posibilidades de oxidarse, dado que una de las principales funciones del  $\alpha$ -tocoferol es la de ser un antioxidante lipídico en vivo (*Ochoa JJ et al, 2007*), bloqueando la reacción en cadena de oxidación de estos AG mediante dos mecanismos: la eliminación de los radicales libres producidos durante la peroxidación, y por otro lado, actuando como quelante del oxígeno singlete.

De este modo, la evolución mostrada para el ácido ascórbico, podría estar protegiendo la presencia en el recién nacido, tanto a término como prematuro, de  $\alpha$ -tocoferol y por extensión de los importantes AGPI.

## 5.- Capacidad antioxidante total (CAT)

La **Figura 22** muestra la capacidad antioxidante total de las leches maternas objeto de estudio.



**Figura 22.-** Capacidad antioxidante total en leche materna a término y pretérmino en distintas etapas de la lactación (calostro, leche de transición y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición

La capacidad antioxidante total es una medida de todos los antioxidantes presentes en un líquido biológico (en este caso la leche), tales como vitaminas, sistemas antioxidantes de radicales enzimáticos, antioxidantes desconocidos y las interacciones antioxidantes. Se trata de un marcador sensible que permite detectar pequeñas diferencias mucho mejor que las mediciones de los antioxidantes por separado (Quiles JL et al, 2007).

Como se aprecia en la **Figura 22**, existen diferencias estadísticamente significativas durante las primeras etapas de la lactación entre el grupo a término y el pretérmino. Concretamente, es la leche de las madres con parto a término la que tiene más capacidad antioxidante total en el calostro y leche de transición, pasando a ser similar en la etapa madura.

Parece ser, por tanto, que en niños prematuros, las sustancias antioxidantes encargadas de contrarrestar el mayor estrés oxidativo que se da en estos casos, no han pasado a la leche en cantidad suficiente, tal vez por inmadurez del propio sistema antioxidante. Sea como fuere, esta diferencia significativa debe existir por alguna razón, por lo que es lógico pensar que, tal y como se lleva postulando desde un inicio, las formulas para lactantes a término y las formulas para prematuros adoptasen también dicha diferencia.

Estudios realizados al efecto, no hallaron diferencias significativas en los valores medianos de la capacidad antioxidante total en leche materna fresca en comparación con las fórmulas lácteas (*Turoli D et al, 2004*), aun con el mayor contenido vitamínico que incluyen estas últimas.

Una posible explicación podría ser que la capacidad antioxidante total incluye las actividades de todos los sistemas antioxidantes presentes en la muestra de leche. La leche materna posee, como se dijo en los antecedentes, muchos sistemas antioxidantes de radicales enzimáticos (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa...) y pueden producirse muchas interacciones entre los diferentes compuestos.

En las fórmulas lácteas, la presencia del mismo efecto antioxidante que en la leche materna puede explicarse por el mayor contenido vitamínico (vitaminas A, E y C).

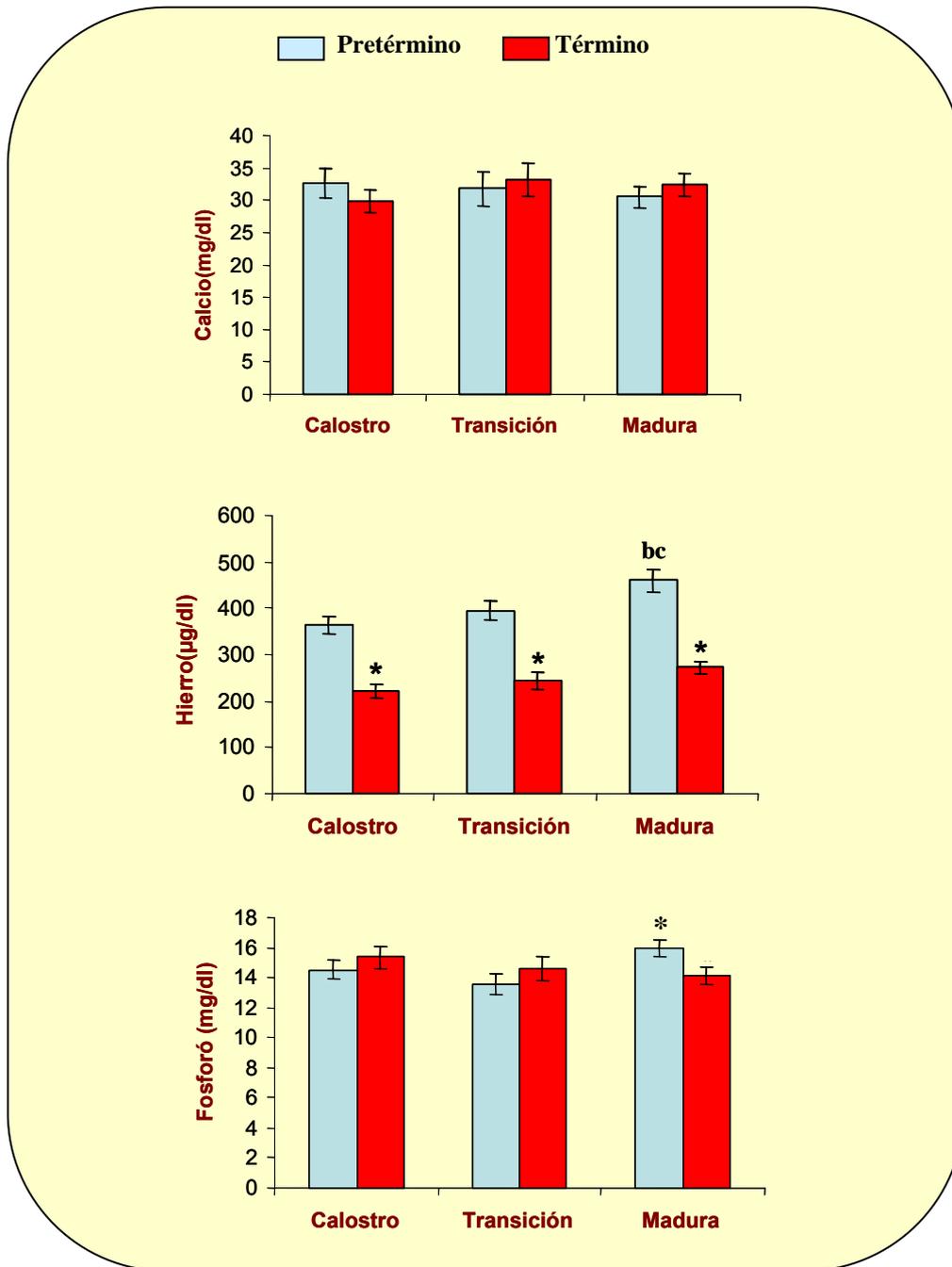
Además, entre las distintas fórmulas lácteas, la CAT fue mayor en aquellas con mayor concentración de vitamina C (*Turoli D et al, 2004*).

En lo que respecta a las diferentes etapas de la lactación, el ritmo es similar en ambos grupos como se observa en la gráfica, existiendo unos mayores valores de CAT en el calostro. Estos valores irán decreciendo en leche de transición y posteriormente, en leche madura.

Esta mayor CAT en calostro es lo que cabía esperar, dado que como se dijo en los antecedentes, el nacimiento se acompaña de un incremento de la agresión oxidativa, al cambiar el entorno intrauterino hipóxico con baja presencia de radicales libres por otro con mayor contenido en oxígeno del aire inhalado que supone un mayor estrés por los mayores niveles en el entorno extrauterino.

## 6.- Contenido en minerales de la leche materna

Se ha analizado el contenido de calcio, hierro, fósforo, cobre, magnesio y zinc (**Figuras 23 y 24**).



**Figura 23.-** Contenido en calcio, hierro y fósforo en leche materna a término y pretérmino en diferentes etapas de la lactación (calostro, transición, y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro;

**c:** Leche madura vs. Leche de transición

Para el calcio no se observan diferencias estadísticamente significativas ni entre leches a término y pretérmino, ni entre las distintas etapas de la lactación.

Durante el embarazo se transfiere calcio de la madre al feto, sobre todo durante el último trimestre (*Jensen et al, 1995*). Durante ese periodo, el aumento de la eficacia absorbente del mineral ayuda a cubrir las necesidades, por lo que no se requiere un aumento de la ingesta. Ambos, madre y niño tendrán, en situaciones normales, unos niveles adecuados. Tal vez sea por ello que durante las distintas etapas de la lactación esto siga siendo así, y por tanto no haya cambios en su aporte, al tener el recién nacido, tanto a término como prematuro el que necesita.

El fósforo no muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a la madurez de la leche en el grupo a término, aunque sí en el grupo pretérmino, con un mayor valor en la leche madura. Este valor en la leche madura es también superior al encontrado en el grupo a término.

La relación entre el calcio y el fósforo de la leche materna no tiene que ver con los valores del plasma materno (*Casey CE et al, 1995*). Sin embargo, algunos estudios demuestran que la ingesta aumentada de calcio por parte de la madre produce un aumento de calcio en su leche (*Prentice A et al, 1995*).

Finalmente, las mayores diferencias entre grupos son encontradas en el hierro, el cual presenta unos mayores valores en el grupo pretérmino durante todas las etapas de lactación estudiadas, siendo los máximos valores los encontrados en la leche madura de madres con parto prematuro.

Una paradoja respecto a esos mayores niveles en prematuros, sería que, como está demostrado, estos tienen mayor prevalencia de anemia por deficiencia de hierro (*Leung AK et al, 2001*), y sin embargo como se observa, el contenido en la leche de madres con parto pretérmino es mayor, por lo que el defecto podría estar en un fallo en el transportador del mismo, la transferrina sérica.

Un estudio de Schiza V et al, en 2007, desveló que las cantidades de transferrina sérica eran notablemente bajas por debajo de las 6 semanas posparto, tras las cuales comenzaban a aumentar, estabilizándose del tercer al duodécimo mes (*Schiza V et al, 2007*). A este nivel, la vitamina C podría jugar un papel fundamental, en el aumento de la absorción de dicho hierro que no se absorbe por el descrito fallo en el transporte, evitando así que quede libre.

La predisposición a la anemia en los prematuros es debida principalmente a tres factores: a la pérdida de las reservas de este ión acumuladas en el tercer trimestre, al gran número de extracciones de sangre requeridas durante la internación y a la tasa rápida de recanalización del crecimiento (*catch up*), que necesita igualmente una rápida expansión de la masa de glóbulos rojos. La *Academia Estadounidense de Pediatría* recomienda incluso la suplementación temprana de hierro a razón de 2-3 mg/kg/día en los recién nacidos prematuros a los 2 meses de vida, aunque esta administración temprana también se asoció con deficiencia de este ión. Todo ello contando con que, como se ha señalado anteriormente, los niveles de este mineral en la leche de los recién nacidos pretérmino ya están aumentados de por sí.

Una alternativa es la administración gradual hasta 5 mg/kg/día desde las 2 semanas de vida, que demostró reducir la incidencia de la deficiencia de ese elemento en los niños de muy bajo peso al nacer, con menos de 1 300 g. La administración temprana de 2-4 mg/kg/día de hierro a las 2 semanas también fue avalada por otros investigadores (*Oski F et al, 1993*).

Una de las preocupaciones de esta suplementación temprana con hierro a las 2 semanas es la producción de radicales libres que puede incrementar el estrés oxidativo, sobre todo en los recién nacidos prematuros que tienen capacidad limitada para asimilar el hierro libre y degradar los radicales libres (*Leung AK et al, 2001*).

Por esta misma razón, habría que estudiar si dichos niveles aumentados de hierro en prematuros, unido a que la vitamina C mantiene el mismo comportamiento en la leche materna en las mismas etapa de la lactación,

podrían ser perjudiciales para el niño prematuro por actuar éste como prooxidante (por la reacción de Fenton, tal como se describió en los antecedentes). Otra posible razón de esta mayor presencia de hierro en niños prematuros, puede ser que estos nacen con unos depósitos del mineral disminuidos, por la ausencia del transporte placentario del último trimestre de la gestación, con lo que el hierro se deplecciona hacia las 6-8 semanas de edad, coincidiendo con la reactivación de la eritropoyesis (Lozzof B, 1991).

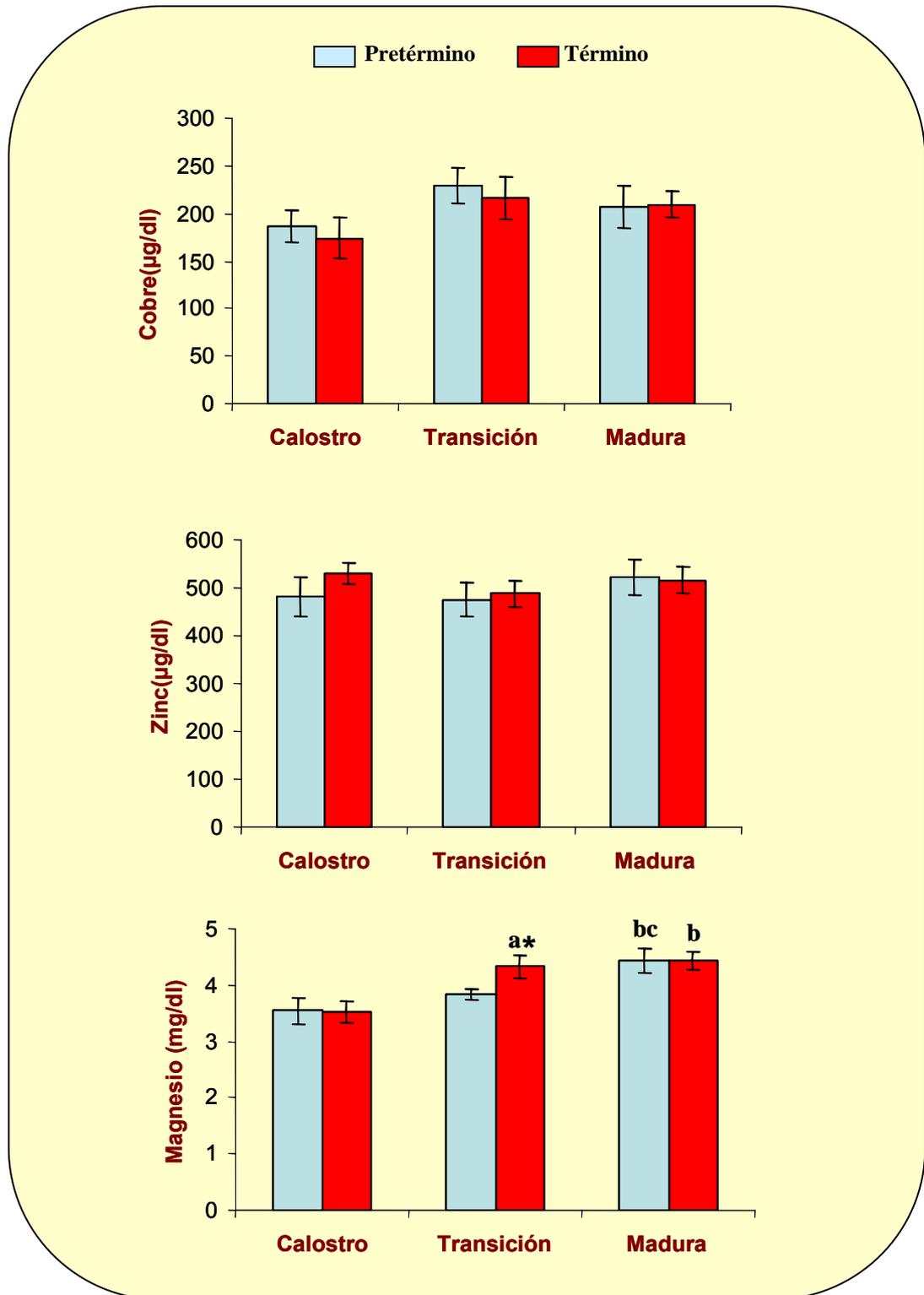
Estos datos aportan una mayor información para la elaboración de fórmulas infantiles.

Para el cobre y el zinc, no se observan diferencias estadísticamente significativas ni entre leches a término y pretérmino, ni entre las distintas etapas de la lactación. El balance de zinc en nuestro organismo presenta una regulación muy eficaz ya desde temprana edad, por lo que es difícil encontrar estados de deficiencia, salvando claro los que estén asociados a patologías concretas (Leung AK et al, 2001)

El magnesio muestra un aumento en su concentración conforme aumenta la madurez de la leche, sin que se observen diferencias estadísticamente significativas entre leches a término y pretérmino, salvo en la leche de transición con un mayor valor en el grupo a término.

Aunque su cantidad podría considerarse pequeña en leche materna, al estar unido a proteínas de bajo peso molecular, aumenta su biodisponibilidad. El magnesio de la leche humana no suele corresponder a sus valores en el suero materno (Leung AK et al, 2001).

Distintos estudios afirman que la cantidad de magnesio no aumenta con la lactancia (Prentice et al, 1995; Casey et al, 1995), al contrario de lo que aparece en la figura 24, pero hay que remarcar en este sentido, que son estudios antiguos y realizados con unos métodos de detección menos moderno que los que se han utilizado para obtener los resultados de esta tesis (HPLC-EQ), por lo que los aquí expuestos podrían tener más relevancia.



**Figura 24.-** Contenido en minerales en leche materna a término y pretérmino en diferentes etapas de la lactación (calostro, transición, y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición

## 6.- Perfil lipídico de las leches maternas

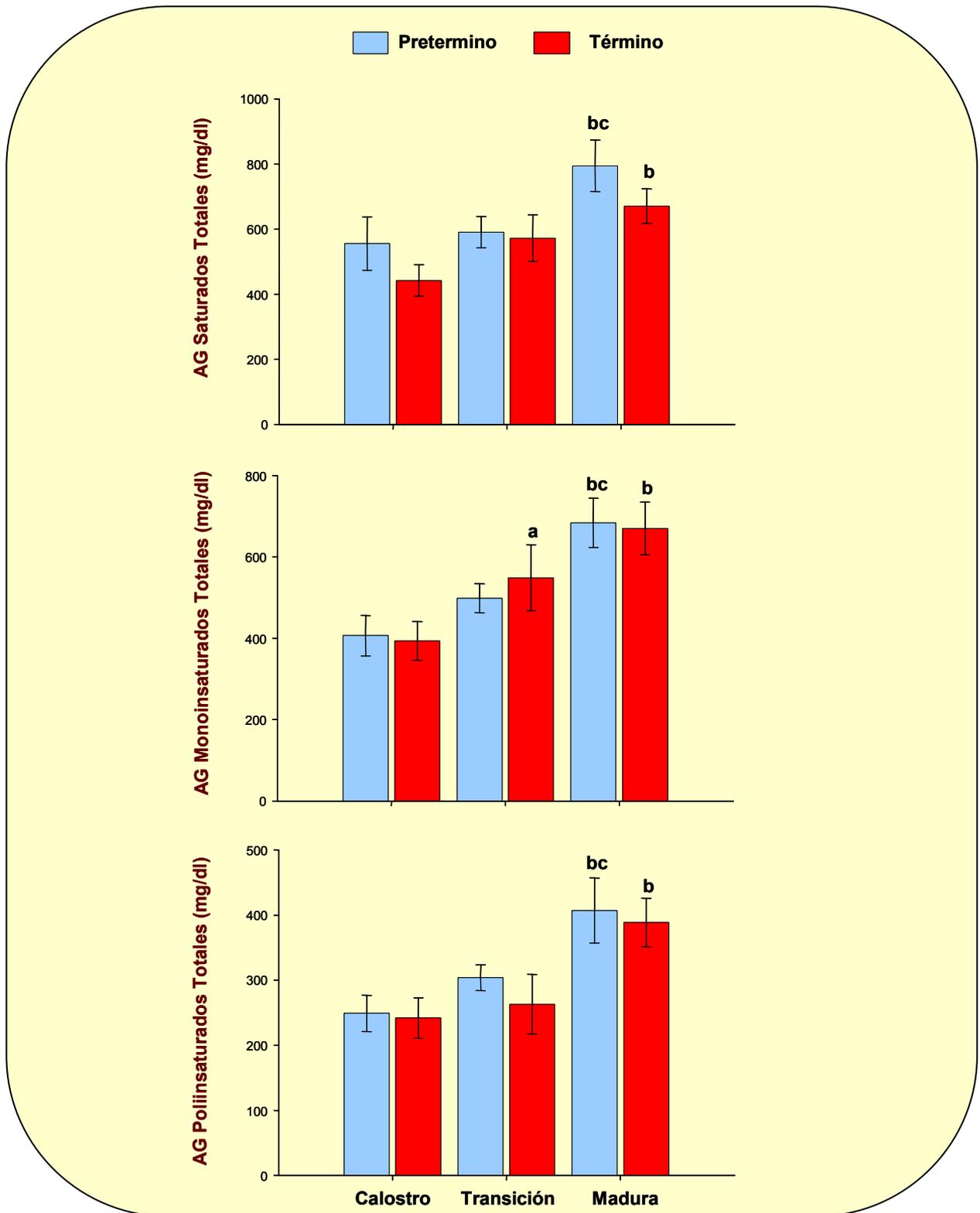
El análisis **cuantitativo** de ácidos grasos (total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados expresado en mg/dl) se puede observar en la **Figura 25**, y no muestra diferencias para el tipo de leche entre el grupo pretérmino y a término.

Las diferencias se encontraron entre las distintas etapas de la maduración. Así, la leche madura muestra una concentración significativamente mayor de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados en comparación con la leche de transición y el calostro.

Cabe destacar a este nivel, que las cantidades de ácidos grasos saturados, son ligeramente superiores en los prematuros, aunque no estadísticamente significativas. Son sobre todo, del tipo C10:0 y C12:0, pero aunque puedan parecer alto el contenido, éstos ácidos grasos son fácilmente absorbidos por el niño pretérmino y pueden ser beneficiosos desde el punto de vista de la absorción del calcio (*Genzel-Boroviczeny O et al, 1997*).

Como ya se dijo, el  $\alpha$ -tocoferol y otros antioxidantes liposolubles muestran un comportamiento inverso al de los ácidos grasos, cuando lo lógico es que mostraran un comportamiento similar. Este hecho podría tener un efecto protector, y es que los AGPI, que tanta importancia cobran en esta etapa de la vida, tendrían menos posibilidades de oxidarse, dado que una de las principales funciones del  $\alpha$ -tocoferol es la de ser un antioxidante lipídico en vivo, bloqueando la reacción en cadena de oxidación de estos AG mediante dos mecanismos: la eliminación de los radicales libres producidos durante la peroxidación, y por otro lado, actuando como quelante del oxígeno singlete.

También se encontró una correlación negativa entre coenzima Q<sub>10</sub> y el total de ácidos grasos (-0.295;  $P < 0.05$ ), total de ácidos grasos saturados (-0.308;  $P < 0.05$ ) y total de ácidos grasos monoinsaturados (-0.292;  $P < 0.001$ ), hecho que podría ir en el mismo sentido, evitando la oxidación de los AGPI en los momentos en que su aporte al recién nacido es menor.



**Figura 25.-** Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados totales (mg/dl) en leche materna a término y pretérmino en distintas etapas de la lactación (calostro, leche de transición y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición.

El análisis **cualitativo** (como porcentaje del total de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados) se muestra en la **Figura 26**. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio, ni entre las distintas etapas de lactación, salvo en el contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la leche madura de madres con parto a término respecto a la del pretérmino, mayor en esta última.

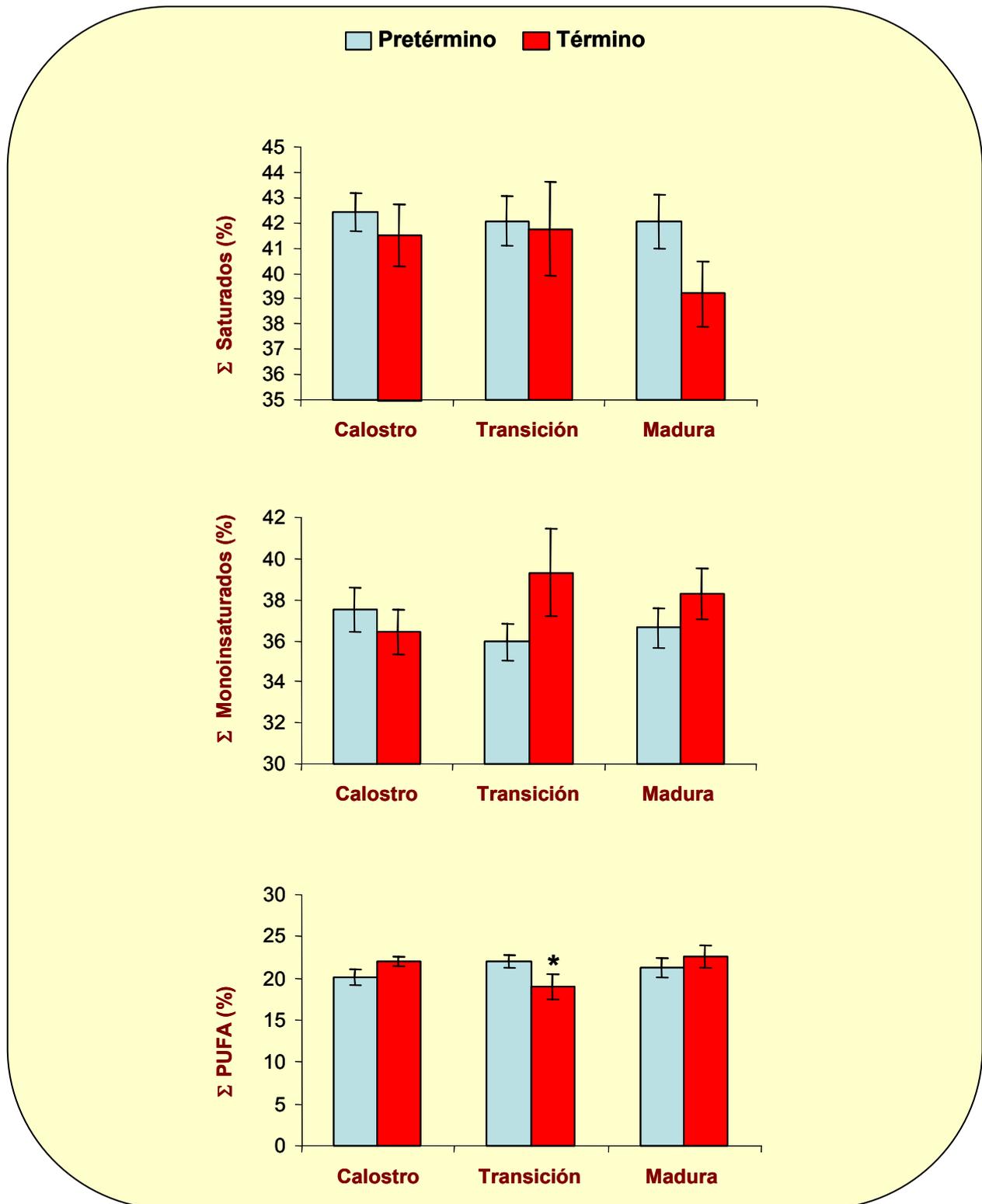
Los ácidos grasos saturados no presentan diferencias estadísticamente significativas entre el grupo a término y el pretérmino.

En otros estudios, como los de *Innis SM et al*, ya mencionado en los antecedentes, los ácidos grasos saturados representan el 40% de los ácidos grasos leche materna, por lo que los resultados representados en la figura 26 parecen mantener la misma línea.

Por otro lado, cabe destacar que las cantidades de ácidos poliinsaturados, concretamente las de las familias  $\omega 3$  y  $\omega 6$  varían enormemente de acuerdo a la composición de la dieta materna (*Innis SM, 1992*). Así, las variaciones de la dieta se traducen en cambios en los LCPUFA de 20 átomos de carbono y más, observándose que las variaciones en los valores del DHA (22:6n3) están muy influenciadas por las cantidades de pescado en la dieta materna.

En un estudio de *Makrides M et al*, en 1998, se vio que madres lactantes que recibieron al 15º día posparto suplementos de DHA aumentaron la concentración de este ácido graso en la leche materna de acuerdo a la dosis administrada, no afectándose la situación del estatus antioxidativo midiendo los valores de vitamina A y E)

Siendo así, cabe esperar que dicho contenido dependa de la situación geográfica de las madres, hecho que determina claramente su alimentación (*Mataix J, 2005*). Así, los resultados obtenidos aquí no se corresponderían con los realizados en países donde por su orografía o costumbres culinarias, la alimentación difiera de la de las madres objeto de este estudio.



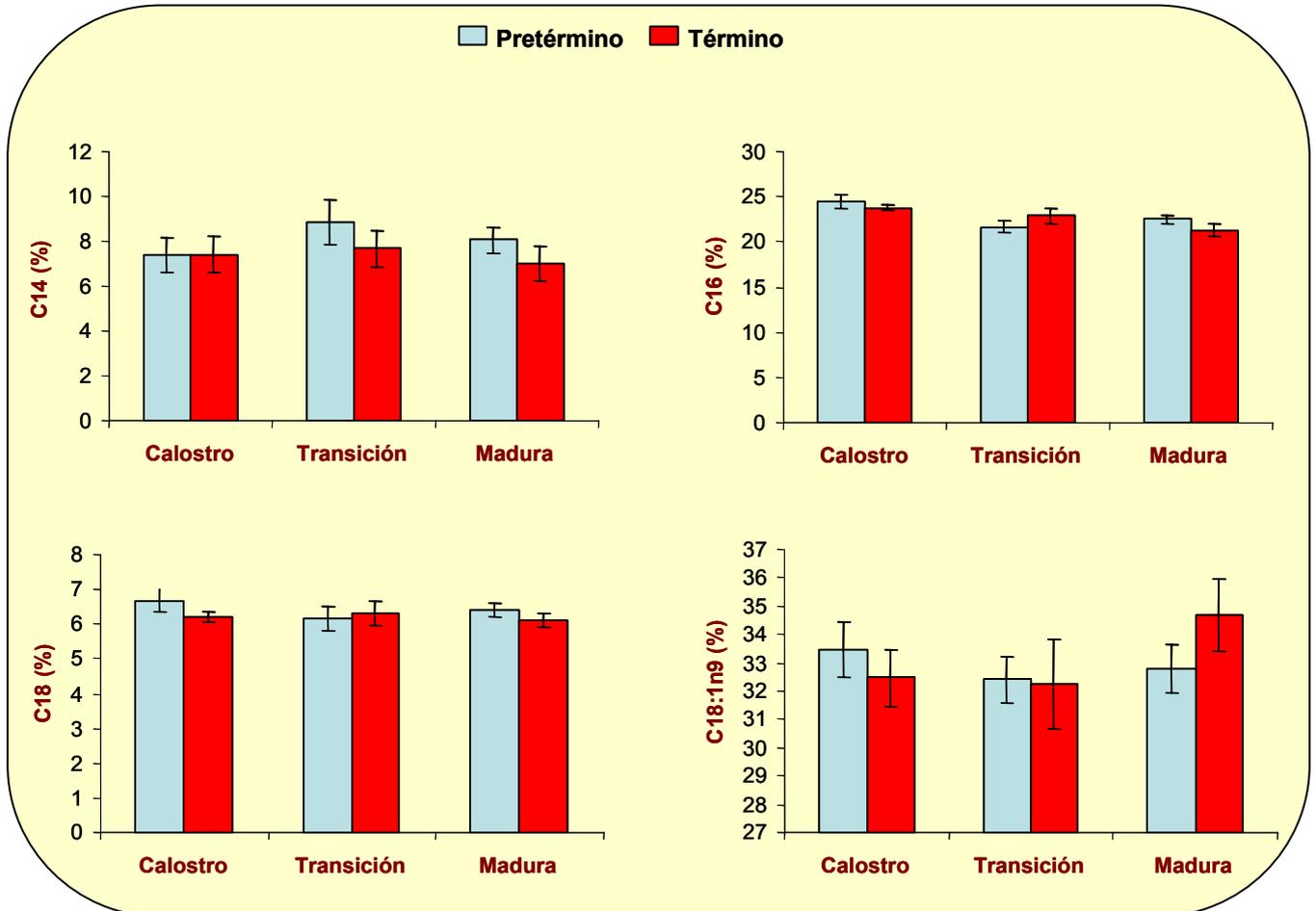
**Figura 26.-** Contenido en ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados totales (%) en leche materna a término y pretérmino en distintas etapas (calostro, leche de transición y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición.

Los porcentajes correspondientes a los ácidos grasos C14:0, C16:0 (ácido palmítico), C18:0 (ácido esteárico) y 18:1  $\omega$ -9 (ácido oleico), son mostrados en la **Figura 27**.



**Figura 27.-** Porcentaje de los ácidos grasos C14:0, C16:0, C18:0 y C18:1  $\omega$ -9 en leche materna a término y pretérmino. Expresados en % del total de ácidos grasos determinados.

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición.

No se observan diferencias ni entre las distintas etapas de la lactación ni entre los grupos objeto de estudio.

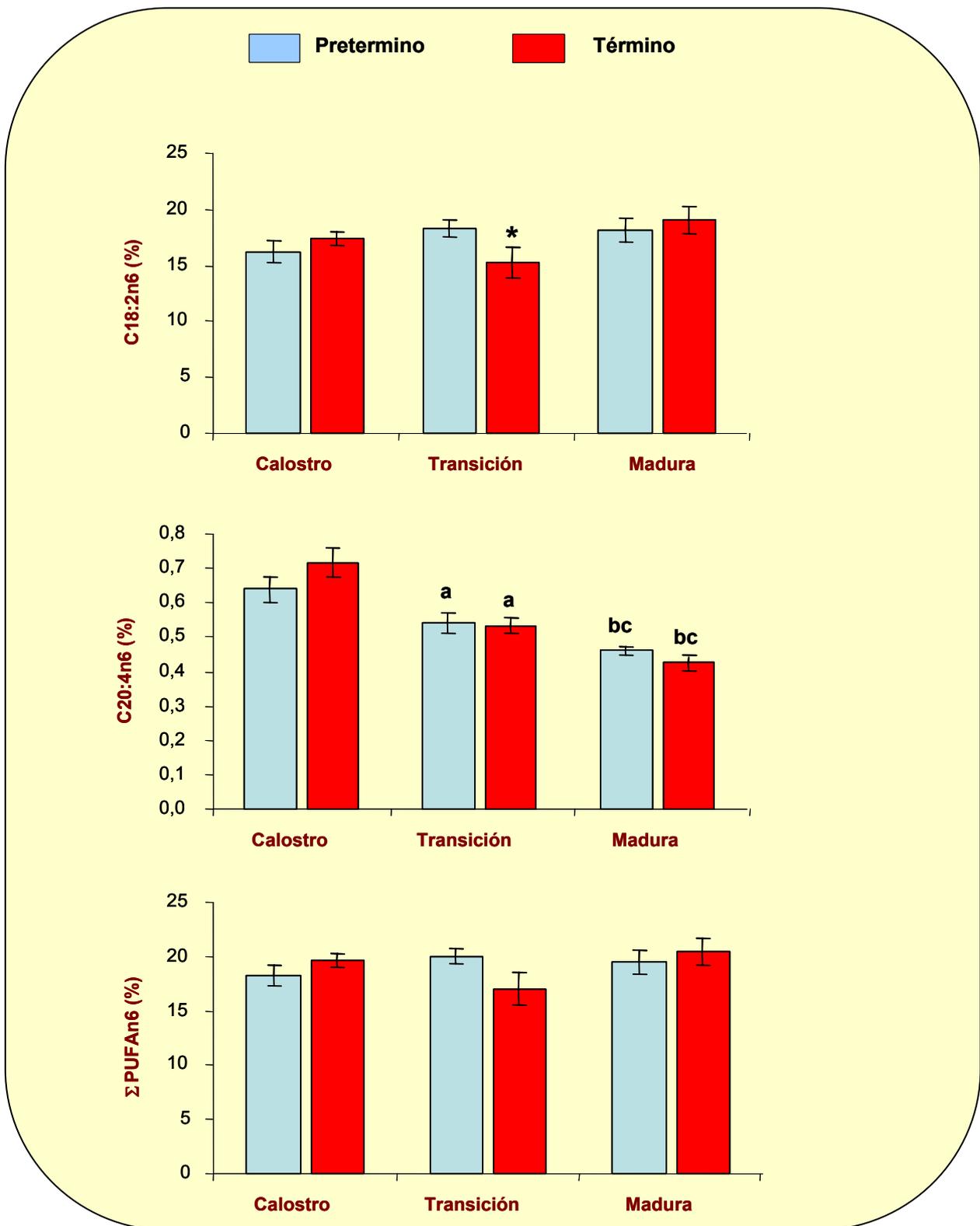
En otros estudios, como el de *Innis et al*, los ácidos láurico y mirístico representan el 10-12% del total de ácidos grasos, y el palmítico y el esteárico el 20 y el 8% respectivamente, resultados muy similares a los representados aquí.

El total de ácidos grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ -6 y el de los ácidos grasos C18:2  $\omega$ -6 (ácido linoleico) y C20:4  $\omega$ -6 (ácido araquidónico) son mostrados en la **Figura 28** expresados como porcentaje del total. El total de ácidos grasos poliinsaturados y el porcentaje correspondiente al ácido linoleico muestran un similar comportamiento, sin diferencias entre grupos ni entre etapas de lactación. Sin embargo, con respecto al ácido araquidónico, se observan en ambos grupos un menor valor en la leche madura en comparación con los valores obtenidos en el calostro y en la leche de transición.

Esta menor presencia de ácido araquidónico podría hacer que el porcentaje  $\omega$ 3/  $\omega$ 6 fuese más favorable a los primeros en las primeras etapas de la lactación, en los que ácidos grasos de la serie  $\omega$ 3 como el eicosapentaenoico (EPA) y sobre todo el docosahexaenoico (DHA), ejercerían un papel clave en procesos de formación de membranas, maduración de la retina, y otros importantes efectos a nivel visual y cerebral.

En otros estudios, los valores de ácido linoleico oscilan del 8 al 16% del total de AG, pero podrían alcanzar valores más altos como ya se ha dicho para el % total, en mujeres veganas (*Sanders TAB et al, 1992*). Del mismo estudio se deriva que las variaciones de la dieta se traducen en cambios en los LCPUFA de 20 átomos de carbono y más, observándose que las variaciones en los valores del DHA (22:6n3) están muy influenciadas por las cantidades de pescado en la dieta materna, mientras que la cifra de AA (ácido araquidónico, 20:4n6) que constituye alrededor de un 0,5% del total de ácidos grasos, no depende del contenido de su precursor ácido linoleico (C18:2n6).

En dichos estudios se comprobó además, que madres lactantes que recibieron suplementos de LCPUFAs después del parto aumentaron la concentración de estos ácidos grasos en la leche materna de acuerdo a la dosis administrada, pero no se afectaron los valores de ácido araquidónico en la leche materna, ni la situación del estatus antioxidativo midiendo los valores de vitamina A y E.)



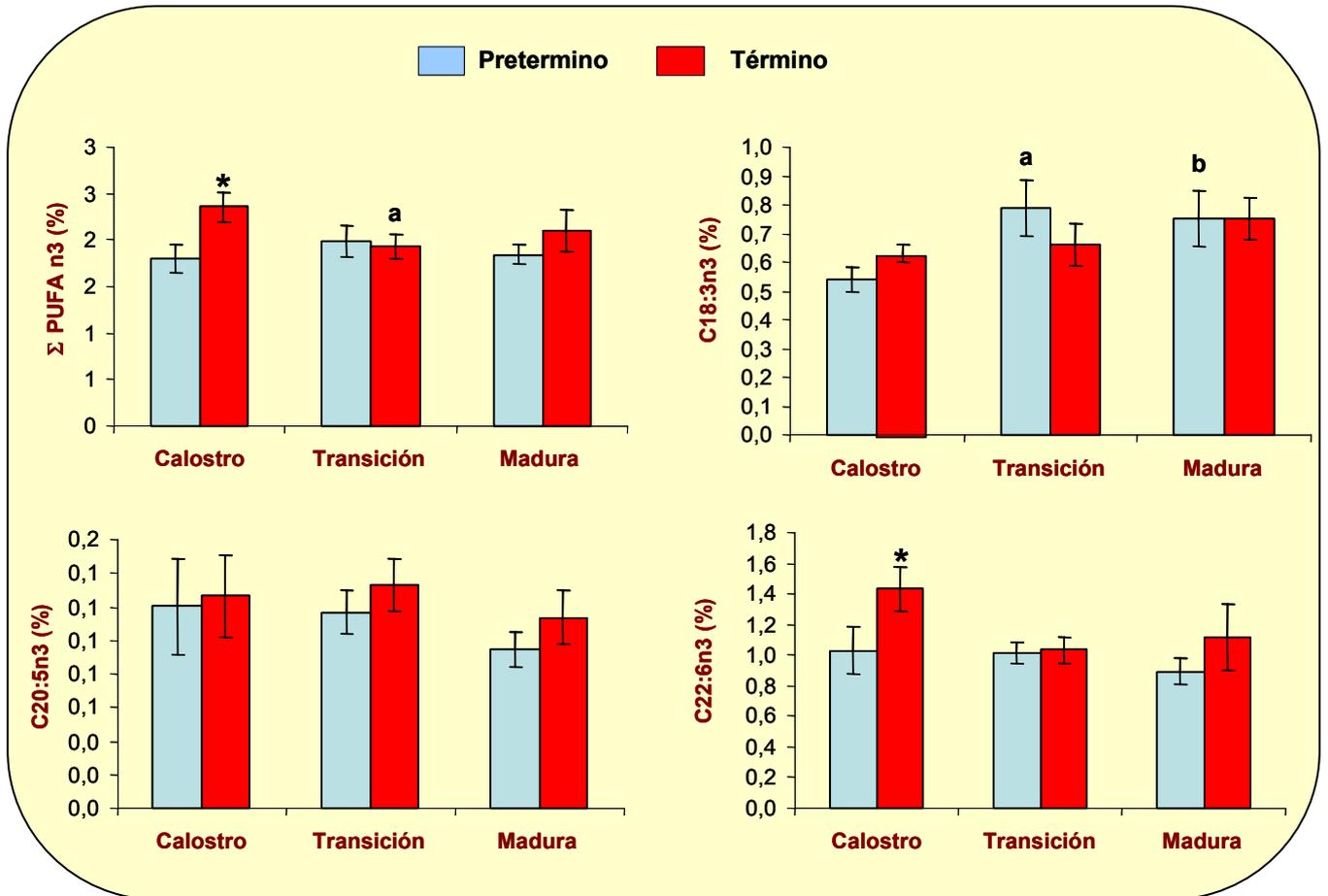
**Figura 28.-** Total de ácidos grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ -6 o n-6 y porcentaje de los ácidos grasos C18:2 n-6 y C20:4 n-6 en leche materna a término y pretérmino.

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición.

Finalmente, la **Figura 29** muestra los resultados obtenidos para los ácidos grasos poliinsaturados totales de la serie  $\omega$ -3 y de los porcentajes correspondientes a los ácidos grasos C18:3  $\omega$ -3 (ácido linolenico), C20:5  $\omega$ -3 (ácido eicosapentaenoico) y C22:6  $\omega$ -3 (ácido docosahexaenoico).



**Figura 29.-** Porcentaje del total de ácidos grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ -3 o n-3 y de los ácidos grasos C18:3 n-3, C20:5 n-3 y C22:6 n-3 en leche materna a término y pretérmino. Expresados en % del total de ácidos grasos determinados.

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición

La mayor diferencia observada es la existente en el calostro entre los grupos objeto de estudio para el total de ácidos grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ -3, siendo las leches procedentes de madres a término las que mayor porcentaje presentan. Similar es la diferencia que muestra el ácido docosahexaenoico (DHA) en el calostro para los dos grupos de estudio.

La explicación a este aumento se antoja clara a tenor de los numerosos estudios realizados sobre la importancia de los LC-PUFA y más concretamente del DHA en las primeras etapas de la vida.

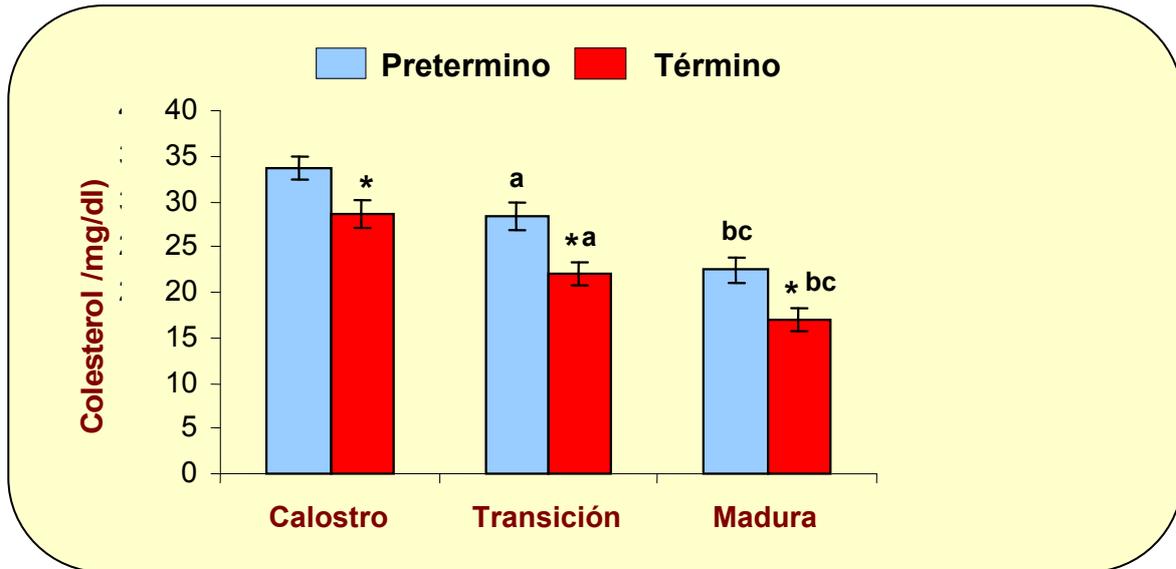
Los ácidos grasos esenciales y sus derivados poliinsaturados de larga cadena desempeñan un papel crucial en el desarrollo fetal y en el periodo de gestación (*Dutta-Roy AK, 1997; Kurlak y Stephenson, 1999*), y lo mismo ocurre en los primeros días de vida (*Mitmesser SH, Jensen CL, 2007; Kidd PM, 2007; Uauy et al, 2000*). Es de entender por tanto, que el calostro muestre tal contenido de los mismos.

El DHA se ha demostrado fundamental en el desarrollo mental del recién nacido (*Belkind-Gerson J et al, 2008; Dangour AD, Uauy R, 2008*), llegándose incluso a afirmar, que de su correcto aporte en esta primera etapa de la lactación dependerá el coeficiente intelectual del niño en la edad adulta con una variación de hasta 6 puntos (*Gustafsson PA, 2004; Helland IB, 2003*). También está implicado en la correcta maduración de la retina (*Cheatham CL et al, 2006*), por lo que la agudeza visual también podría estar condicionada por dicho aporte de DHA en los primeros días de vida. Asimismo, parece ser fundamental para el correcto desarrollo del sistema motor del niño (*Bakker EC et al, 2009*), de tal forma que la diferencia observada en la figura 29 resulta crucial tanto para un correcto desarrollo mental, como visual y motor, con las implicaciones que podría tener en las capacidades y habilidades del niño en la edad adulta.

Puede entenderse por tanto que en el niño pretérmino pueda ser necesario suplementar con este ácido graso esencial, al ser menor el aporte que recibe en la leche materna como se ha podido observar en la figura 29.

## 7.- Contenido de colesterol en leche materna

La **Figura 30** muestra el contenido en colesterol de las leches maternas objeto de estudio.



**Figura 30.-** Contenido en colesterol (mg/dl) en leche materna a término y pretérmino en distintas etapas de la lactación (calostro, leche de transición y leche madura).

\* Diferencias entre grupo pretérmino y a término para cada etapa de la lactación ( $P < 0.05$ ).

Diferencias relativas a la etapa de lactación de cada grupo:

**a:** Leche de transición vs. Calostro; **b:** Leche madura vs. Calostro; **c:** Leche madura vs. Leche de transición

Se observa una disminución de esta molécula asociada a la madurez de la leche en ambos grupos, siendo los valores obtenidos en leches provenientes de madres pretermino superiores a los encontrados en leches a término.

Los niveles altos en las primeras etapas de la lactación podrían encontrar su explicación en el hecho de que sirven para inducir el desarrollo de procesos enzimáticos relacionados con la absorción, síntesis y degradación del propio colesterol, y ello facilitaría su utilización en la edad adulta.

Otros estudios recientes, como el de Owen et al, en 2008, evidencian que a partir de los 30 ó 40 años los niveles de colesterol sanguíneo se hallan más elevados entre los individuos que fueron lactados artificialmente que entre los amamantados.

Estudios de Osborn et al, en 1500 jóvenes, describieron los cambios patológicos desde el nacimiento hasta los 20 años, concluyendo que los niños alimentados con lactancia artificial metabolizan mal el colesterol.

Un hecho curioso es que la propia prematuridad podría ser consecuencia de niveles bajos de colesterol en las madres, como han propuesto recientemente *Edison RJ et al*, en 2007. En efecto, aunque presentar niveles bajos de colesterol generalmente se considera algo favorable, estos investigadores del National Human Genome Research Institute (Estados Unidos), sugieren tras su investigación que niveles muy bajos de colesterol en mujeres embarazadas podrían perjudicar la salud del feto. Los investigadores hallaron que las futuras madres cuyo colesterol total estaba por debajo de 159 mg /dl dieron a luz, en promedio, niños con casi 150 gramos menos de peso que los de madres que presentaban niveles de colesterol que superaban esta cantidad. Además, el 12,7% de las mujeres que tenían bajos niveles de colesterol dieron a luz de manera prematura, en comparación con apenas el 5% de las que presentaban niveles superiores.

Estos bajos niveles en la madre podrían estar causados por la propia demanda de colesterol del feto y del recién nacido, conclusión que se deriva del elevado aporte del mismo que evidencia la figura 30 ya mencionada, siendo además aun mas alto en prematuros. Podría ser por tanto, todo por la misma causa.

Otros estudios, como el de Harzar et al, en 1983, muestran una tendencia parecida a la aquí expuesta. En dicho estudio se observó que, dependiendo de las técnicas de muestreo, el rango de colesterol era de 9 a 41 mg/dl, modificandose a lo largo del tiempo con una disminución de 1,7 veces durante los primeros 36 días, y con estabilización en una cifra de 20 mg/dl aproximadamente a los 15 días del parto.

Tal como se dijo en los antecedentes, el colesterol es un componente esencial de todas las membranas, y es necesario para el crecimiento, la replicación y el mantenimiento. Siendo así, parece lógico este aporte aumentado en los primeros días de vida.

Por último, y teniendo en cuenta que diversos estudios han observado que lactantes alimentados con leche materna muestran concentraciones plasmáticas de colesterol superiores a las de los lactantes alimentados con fórmulas lácteas artificiales (*Wong WW et al, 1993; Schnitzer E et al, 2007*), parece lógico pensar, a la vista de los resultados expuestos en la figura 30, que debería estudiarse la adición del mismo a dichas fórmulas en un futuro no muy lejano.

## VI. CONCLUSIONES

**CONCLUSIÓN 1<sup>a</sup>.**- La leche materna presenta cantidades apreciables de coenzima Q<sub>10</sub>, siendo las concentraciones encontradas en leches procedentes de madres a término casi un 50% superior a las encontradas en leches procedentes de madres prematuras, sobre todo en las leches obtenidas en las dos primeras etapas de la lactación, calostro y leche de transición. Un comportamiento similar es mostrado por los isómeros  $\alpha$ -tocoferol y  $\gamma$ -tocoferol, ambos de gran importancia antioxidante, y lo contrario para el ácido ascórbico, hecho este último que facilita la presencia de tocoferol cuando el aporte sea bajo al regenerarlo.

**CONCLUSIÓN 2<sup>a</sup>.**- La capacidad antioxidante total (CAT) es mayor en las leches de madres con parto a término, siendo mayor en calostro y decreciendo conforme avanzan la maduración de la misma, hecho a destacar, dado que el nacimiento se acompaña de un incremento de la agresión oxidativa, al cambiar el entorno intrauterino hipóxico con baja presencia de radicales libres por otro con mayor contenido en oxígeno del aire inhalado, que supone un mayor estrés por los mayores niveles en el entorno extrauterino.

**CONCLUSIÓN 3<sup>a</sup>.**- El hierro presenta valores mayores en niños pretérmino durante todas las etapas de lactación estudiadas, siendo los máximos valores los encontrados en la leche madura. Habría que estudiar si dichos niveles aumentados de hierro en prematuros, unido su posible papel como prooxidante, podrían ser perjudiciales para el niño prematuro por actuar aquel como prooxidante.

**CONCLUSIÓN 4<sup>a</sup>.**- Existe una clara diferencia a nivel cualitativo en el calostro en cuanto a los ácidos grasos poliinsaturados de la serie  $\omega$ -3 por su mayor contenido en ácido docosahexaenoico (DHA), siendo las leches procedentes de madres a término las que mayor porcentaje presentan, lo que evidencia la

importancia de este tipo de ácidos grasos, en concreto en este último en las primeras etapas de la vida.

**CONCLUSIÓN GENERAL.-** La leche de madres con parto a término está mejor preparada para la defensa antioxidante del recién nacido respecto a la leche de madres con parto prematuro, al menos en lo que se refiere al coenzima Q y a la vitamina E, concretamente al isómero más importante, el  $\alpha$ -tocoferol.

Estos resultados son de gran interés y nos aportan datos sobre la composición de la leche materna que pueden ser considerados a la hora de elaborar fórmulas infantiles.

## VI. BIBLIOGRAFÍA

Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods in enzymology* 1984;150:121-127.

Aitken RJ, De Iuliis GN. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells *Reprod Biomed Online*. 2007 Jun;14(6):727-33. Review.

Amaizu N, Shulman R, Schanler R, Lau C. Maturation of oral feeding skills in preterm infants. *Acta Paediatr*, 2008: 97(1):61-7

Anales españoles de pediatría. Asociación Española de Pediatría (AEP), ISSN 1695-4033, Vol. 64, Nº. 2, 2006 , pags. 126-131

Aniya, Y.; Nieto, A. Oxidative stress induced activation of microsomal glutathione 5-transferase in isolated rat liver. *Biochemical Pharmacology* 1993;45(1):37-42.

Anonyme. Acrodermatitis enteropathica. Zn and human milk. *Nutr Rev* 1979; 36:241-2.

Antoine C, Young BK. Fetal lactic acidosis with epidural anesthesia. *Am J Obstet Gynecol* 1982; 142(1):55-9

Antolín, L.; Rodríguez, C.; Sainz, R.M. et al. Neurohormone melatonin prevents cell damage: Effect on gene expression of antioxidative enzymes. *FASEB J* 1996;10:882-890.

Argüelles F. (Director) Curso de Nutrición Infantil para farmaceuticos. Suplemento de la revista *El Farmaceutico*. Nº 390. Ed. Mayo, 2008

Argüelles Martin F. Evolución de las fórmulas infantiles hacia la composición de la leche de mujer. *Clin Esp Nutr*. 2007;2:39-49

Asakuma, S; Urashima, T; Akahori, M; Obayashi, H; Nakamura, T; Kimura, K; Watanabe, Y; Arai, I; Sanai, Y. Variation of major neutral oligosaccharides levels in human colostrums. *Eur. J. Clin. Nutr*. 2007:1-7

Askie LM, Henderson-Smart DJ, Irwig L, Simpson JM. Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. *N Engl J Med* 2003; 349(10):959-67.

Austgulen R. [Recent knowledge on mechanisms underlying development of pre-eclampsia]. *Tidsskr Nor Laegeforen* 2004; 124(1):21-4.

Aw, T.Y.; Andersson, B.S.; Kennedy, F.G.; Jones, D.P. Intracellular O<sub>2</sub> supply to support mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J*. 1996;143:707-716.

Axelson I, Borulf S, Richard L. et al. Protein and energy intake during weaning: I Effects on growth. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 1987. 76(2):321-7

Babior, B.M. Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Eng. J. Med.* 1998;298:659-668.

Bahl R; Bhandari N; Wahed MA; Kumar GT; Bhan MK. Vitamin A supplementation of women postpartum and of their infants at immunization alters breast milk retinol and infant vitamin A status. *Journal of Nutrition*. 2002 Nov;132:3243-3248

Bakker EC, Hornstra G, Blanco CE, Vles JS. Relationship between long-chain polyunsaturated fatty acids at birth and motor function at 7 years of age. *Eur J Clin Nutr*. 2009 Apr;63(4):499-504.

Ballabriga A, Carrascosa A. *Nutrición en la infancia y en la adolescencia* 3ª Edición. Ergón, Madrid, 2006.

Ballard RA, Truog WE, Cnaan A et al. Inhaled nitric oxide in preterm infants undergoing mechanical ventilation. *N Engl J Med* 2006; 355(4):343-53. Notes: CORPORATE NAME: NO CLD Study Group

Barlow-Walden, L.R.; Reiter, R.J.; Abe, M. et al. Melatonin stimulates brain glutathione peroxidase activity. *Neurochem. Int.* 1995;26:497-502.

Bates CJ, Tsuchiya H. Zn in breast milk during prolonged lactation. *Eur J Clin Nutr* 1990; 44:61-9.

Batra S, Kumar R, Seema, Kapoor AK, Ray G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann Trop Paediatr* 2000; 20(1):27-33

Batra, S.; Kumar, R.; Seema.; Kapoor, A.K.; Ray, G. Alterations in antioxidant status during neonatal sepsis. *Ann. Trop. Paeditr.* 2000;20(1):27-33.

Battino M, Fato R, Parenti-Castelli G, Lenaz G. Coenzyme Q can control the efficiency of oxidative phosphorylation. *Int J Tissue React* 1990; 12(3):137-44.

Battino M, Leone L, Bompadre S. High-performance liquid chromatography-EC assay of mitochondrial coenzyme Q<sub>9</sub>, coenzyme Q<sub>9</sub>H<sub>2</sub>, coenzyme Q<sub>10</sub>, coenzyme Q<sub>10</sub>H<sub>2</sub>, and vitamin E with a simplified on-line solid-phase extraction. *Methods Enzymol* 2004;378:156-162.

Bauer C, Ludwig M, Ludwig I, Bartels H. Factors governing the oxygen affinity of human adult and foetal blood. *Respir Physiol* 1969; 7(3):271-7

Baydas G, Karatas F, Gursu MF et al. Antioxidant vitamin levels in term and preterm infants and their relation to maternal vitamin status. *Arch Med Res* 2002; 33(3):276-80.

Beckman JS. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *J Dev Physiol* 1991; 15(1):53-9

Belkind-Gerson J, Carreón-Rodríguez A, Contreras-Ochoa CO, Estrada-Mondaca S, Parra-Cabrera MS. Fatty acids and neurodevelopment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2008 Aug;47 Suppl 1:S7-9. Review.

Bellinger DC, Wypij D, duDuplessis AJ et al. Neurodevelopmental status at eight years in children with dextro-transposition of the great arteries: the Boston Circulatory Arrest Trial. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2003; 126(5):1385-96

Benfari RC, Eaker E, Stoll JG. Behavioral interventions and compliance to treatment regimens. *Ann Rev Public Health*,1981; 2:431-71.

Bhatla N, Kaul N, Lal N, Kriplani A, Agarwal N, Saxena R, Gupta SK. Comparison of effect of daily versus weekly iron supplementation during pregnancy on lipid peroxidation. *J Obstet Gynaecol Res.* 2009;35(3):438-45.

Bielski, B.H.J.; Arudi, R.L.; Sutherland, M.W. A study of the activity of  $\text{HO}_2^{\cdot-}/\text{O}_2^{\cdot-}$  with unsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.* 1983;258:4759-4761.

Billah MM, Di Renzo GC, Ban C et al. Platelet-activating factor metabolism in human amnion and the responses of this tissue to extracellular platelet activating factor. *Prostaglandins* 1985; 30(5):841-50.

Bilodeau JF, Hubel CA. Current concepts in the use of antioxidants for the treatment of preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Can* 2003; 25(9):742-50

Biri A, Onan A, Devrim E, Babacan F, Kavutcu M, Durak I. Oxidant status in maternal and cord plasma and placental tissue in gestational diabetes. *Placenta* 2006; 27(2-3):327-32

Bis-Gluchowska M, Marciniak B, Szpringer-Bogun E, Rola R, Leszczynska-Gorzela B, Oleszczuk J. [Determination of antioxidative-peroxidative balance in the cord blood of newborns delivered to mothers with diabetes type G1]. *Ginekol Pol* 2001; 72(12A):1255-8.

Bizzarro M, Gross I. Inhaled nitric oxide for the postoperative management of pulmonary hypertension in infants and children with congenital heart disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; (4):CD005055

Blakeborough P, Salter DN, Gurr MI. Digestion of zinc in human milk, cow's milk and commercial babyfood: some implications for human infant nutrition. *Br J Nutr* 1986; 55:209-217.

Bompadre S, Leone L, Politi A, Battino M. Improved FIA-ABTS method for antioxidant capacity determination in different biological samples. *Free Rad Res* 2004;38:831-838.

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

Borevis A., Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 1973; 134:707-716.

Borevis, A.; Chance, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 1973;134:707-716.

Bosi E, Sarugeri E. Advances and controversies in etiopathogenesis of type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 1998; 11(Suppl 2):293-305.

Bossi E, Koerner F. Retinopathy of Prematurity. *Intens Care Med* 1995;21:241-246

Bracci, R. Calcium Involvement in Free Radical Effects (editorial). *Calcif. Tissue Int.* 1992;51:401-405.

Brand PL, Molenaar NL, Kaaijk C, Wierenga WS. Neurodevelopmental outcome of hypoglycaemia in healthy, large for gestational age, term newborns. *Arch Dis Child* 2005; 90(1):78-81

Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. *Annu Rev Biochem* 1994; 63:175-95.

Briceño-Pérez C, Briceño-Sanabria L, Vigil-De Gracia P. Prediction and prevention of preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 2009;28(2):138-55

Browenstein, M.; Saavedra, J.M.; Axelrod, J. Control of pineal N-acetylserotonin by a beta-adrenergic receptor. *Mol. Pharmacol.* 1972;9:605.

Bruck I, Tahan TT, Cruz CR et al. Developmental milestones of vertically HIV infected and seroreverters children: follow up of 83 children. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59(3-B):691-5

Buchmann EJ, Velaphi SC. Confidential enquiries into hypoxic ischaemic encephalopathy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2009 Jun;23(3):357-68.

Bueno M, Bueno O, Lázaro A. Lactancia Materna. En: Bueno M, Sarría A, Pérez-González JM, (eds). *Nutrición en Pediatría (3ª Ed.)*. Madrid: Ergón, 2007; 145-47

Bueno M, Sarría A, Pérez-González JM, eds. *Nutrición en Pediatría (3ª Ed.)*. Madrid: Ergón, 2007; 145-47

=====

Buhimschi C, Weiner CP. Endotoxemia causing fetal bradycardia during urosepsis. *Obstet Gynecol* 2001; 97(5 Pt 2):818-20.

Buhimschi CS, Gokdeniz R, Saade GR, Buhimschi IA, Garfield RE. The effect of chronic nitric oxide synthase inhibition on blood pressure and heart rate in unrestrained pregnant rats as recorded by radiotelemetry. *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181(1):159-64

Buhimschi I, Yallampalli C, Dong YL, Garfield RE. Involvement of a nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate pathway in control of human uterine contractility during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 172(5):1577-84

Buhimschi IA, Kramer WB, Buhimschi CS, Thompson LP, Weiner CP. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 182(2):458-64

Bulgan Kilicdag E, Ay G, Celik A, Ustundag B, Ozercan I, Simsek M. Oxidant-antioxidant system changes relative to placental-umbilical pathology in patients with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2005; 24(2):147-57

Buonocore G, Perrone S, Longini M et al. Non protein bound iron as early predictive marker of neonatal brain damage. *Brain* 2003; 126(Pt 5):1224-30

Butte NF et al. Energy requirements derived from total energy expenditure and energy deposition during the first 2 years of life. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2000, **72**:1558-69

Calder AA, Greer IA. Pharmacological modulation of cervical compliance in the first and second trimesters of pregnancy. *Semin Perinatol* 1991; 15(2):162-72. Notes: GENERAL NOTE: PIP: TJ: SEMINARS IN PERINATOLOGY

Cambonie G, Comte B, Zyzdorczyk C et al. Antenatal antioxidant prevents adult hypertension, vascular dysfunction and microvascular rarefaction associated with in utero exposure to a low protein diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006

Canfield LM, Giuliano AR, Graver, EJC. Carotenoids, retinoids, and vitamin K in human milk. En: Jensen RG (Ed). *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press, 1995; 693-705.

Capasso L, Raimondi F, Capasso A, Crivaro V, Capasso R, Paludetto R. Early cord clamping protects at-risk neonates from polycythemia. *Biol Neonate* 2003; 83(3):197-200.

Caravale B, Allemand F, Libenson MH. Factors predictive of seizures and neurologic outcome in perinatal depression. *Pediatr Neurol* 2003; 29(1):18-25

Carter BM, Holditch-Davis D. Risk factors for necrotizing enterocolitis in preterm infants: how race, gender, and health status contribute. *Adv Neonatal Care*. 2008 Oct;8(5):285-90.

Casado A, López-Fernández ME. Age-correlated changes of the erythrocyte catalase activity in Spanish population. *Gerontology* 2003;49 (4):251-254.

Casey CE, Smith A, Zhang PC. Microminerals in human and animal milks. En: Jensen RG (Ed). *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press, 1995; 622-674.

Castro L, Rodriguez M, Radi R. Aconitase is readily inactivated by peroxy-nitrite, but not by its precursor, nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269(47):29409-15.

Caulfield LE, Himes JH, Rivera JA. Nutritional supplementation during early childhood and bone mineralization during adolescence. *J Nutr* 1995; 125:1104S-1110S.

Cervantes-Munguía R, Espinosa-López L, Gómez-Contreras P, Hernández Flores G, Domínguez-Rodríguez J, Bravo-Cuéllar A. Retinopathy of prematurity and oxidative stress. *An Pediatr (Barc)*. 2006 Feb;64(2):126-31

Chamy VM, Lepe J, Catalan A, Retamal D, Escobar JA, Madrid EM. Oxidative stress is closely related to clinical severity of pre-eclampsia. *Biol Res* 2006; 39(2):229-36.

Chance, B; Sies, H.; Boveris, A. *Physiol. Rev.* 1979;59:577-605.

Chang SJ. Antimicrobial proteins in maternal cord sera and human milk in relation to maternal nutritional status. *Am J Clin Nutr* 1990; 51:183-187.

Chappell LC, Seed PT, Briley A et al. A longitudinal study of biochemical variables in women at risk of preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(1):127-36

Chappell LC, Seed PT, Kelly FJ et al. Vitamin C and E supplementation in women at risk of preeclampsia is associated with changes in indices of oxidative stress and placental function. *Am J Obstet Gynecol* 2002; 187(3):777-84

Chaturvedi, P; Warren, CD; Altaye, M; Morrow, AL; Ruiz-Palacios, G; Pickering, LK; Newburg, DS. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology*. 2001;11:365-372

Chaudhari L, Tandon OP, Vaney N, Agarwal N. Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in gestational diabetics. *Indian J Physiol Pharmacol* 2003; 47(4):441-6

Cheatham CL, Colombo J, Carlson SE. N-3 fatty acids and cognitive and visual acuity development: methodologic and conceptual considerations. *Am J Clin Nutr*. 2006 Jun;83(6 Suppl):1458S-1466S. Review

Cheeseman, KH, Slater TF. An introduction to free radical biochemistry. *British medical Bulletin*. 1993. 49(3):481-493.

Chelchowska M, Laskowska-Klita T, Kubik P, Leibschang J. [The effect of vitamin-mineral supplementation on the level of MDA and activity of glutathione peroxidase and superoxide dismutase in blood of matched maternal-cord pairs]. *Przeegl Lek* 2004; 61(7):760-3

Chelchowska M, Laskowska-Klita T, Leibschang J. The effect of tobacco smoking during pregnancy on concentration of vitamin E in blood of mothers and their newborns in umbilical cord blood]. *Ginekol Pol* 2006; 77(4):263-8

Chen X, Scholl TO. Oxidative stress: changes in pregnancy and with gestational diabetes mellitus. *Curr Diab Rep* 2005; 5(4):282-8.

Cheung PY, Etches PC, Weardon M, Reynolds A, Finer NN, Robertson CM. Use of plasma lactate to predict early mortality and adverse outcome after neonatal extracorporeal membrane oxygenation: a prospective cohort in early childhood. *Crit Care Med* 2002; 30(9):2135-9

Chow, C.K. Vitamin E and oxidative stress. *Free Rad. Biol. Med.* 1991;11:215-232

Chytil F, U-Hag R. Vitamin A mediate gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1990;1:61-73

Cleary TG. Human milk protective mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 2004;554:145-54. Review

Clyman, R.I.; Saugstad, O.D.; Mauray, F. Reactive oxygen metabolites relax the lamb ductus arteriosus by stimulating prostaglandin production. *Circ Res* 1989;64:1-86

Coppa GV, Gabrielli O, Pierani P y cols. Changes in carbohydrate composition in human milk over 4 months of lactation. *Pediatrics* 1993; 91:637-41

Cordero MD, Moreno-Fernández AM, Gomez-Skarmeta JL, de Miguel M, Garrido-Maraver J, Oropesa-Avila M, Rodríguez-Hernández A, Navas P, Sánchez-Alcázar JA. Coenzyme Q10 and alpha-tocopherol protect against amitriptyline toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Mar 15;235(3):329-37.

Crill CM, Helms RA. The use of carnitine in pediatric nutrition. *Nutr Clin Pract.* 2007 Apr;22(2):204-13. Review.

Czapski, G.; Aronovitch, G.; Samoni, A.; et. al. The sensitization of the toxicity of superoxide and vitamin C by cooper and iron. A site specific mechanism. *Elsevier Biomedical* 1983;1:111-118.

Dagnelie PC, van Staveren WA, Roos AH, et al. Nutrients and contaminants in human milk from mothers on macrobiotic and omnivorous diets. *Eur J Clin Nutr* 1992; 46: 355-366

Dai F, Chen WF, Zhou B. Antioxidant synergism of green tea polyphenols with alpha-tocopherol and L-ascorbic acid in SDS micelles. *Biochimie*. 2008 Oct;90(10):1499-505.

Dangour AD, Uauy R. N-3 long-chain polyunsaturated fatty acids for optimal function during brain development and ageing. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2008;17 Suppl 1:185-8. Review

Darlow B.A., Buss H., McGill F., Fletcher L., Graham P., Winterbourn C.C. Vitamin C supplementation in very preterm infants: a randomised controlled trial. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed*. 2005;90:F117–F122

Davies, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp*, 1995;61:1-31.

Davis, J.M. Role of oxidant injury in the pathogenesis of neonatal lung disease. *Acta Paediatr Suppl* 2002;91(437):23-25

Davydova NA, Dmitrieva AI, Selivanov SP, Tkachenko SB, Kovalik TA, Kolomiets SA, Sevast'ianova NV, Novitskiĭ VV. Polymorphism of glutathion-S transferase genes in patients with prostatic cancer. *Urologiia*. 2008 Mar Apr;(2):26-9

de Arriba G, de Hornedo JP, Rubio SR, Fernández MC, Martínez SB, Camarero MM, Cid TP. Vitamin E protects against the mitochondrial damage caused by cyclosporin A in LLC-PK1 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009 Jun 10

de Azeredo MA, de Azeredo LA, Eleuthério EC, Schanaider A. Propofol and N Acetylcysteine attenuate oxidative stress induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: protein carbonyl detection by immunoblotting. *Acta Cir Bras*. 2008 Sep-Oct;23(5):425-8.

del Corral P, Chandler-Laney PC, Casazza K, Gower BA, Hunter GR. Effect of Dietary Adherence with or without Exercise on Weight Loss: A Mechanistic Approach to a Global Problem. *J. Clin. Endocrinol. Metab*, May 2009;94:1602-1607

Delvin E.E., Salle B.L., Claris O., Putet G., Hascoet J.M., Desnoullez L., Messai S., Levy E. Oral vitamin A, E and D supplementation of pre-term newborns either breast-fed or formula-fed: a 3-month longitudinal study. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr*. 2005;40:43–47.

Dewey, K. G., Heinig, M. J., Nommsen, L. A., and Lönnerdal, B. Maternal weight-loss during prolonged lactation. *American Journal of Clinical Nutrition*, 1993;58: 162-166

Dison PJ, Lockitch G, Halstead AC, Pendray MR, Macnab A, Wittman BK. Influence of maternal factors on cord and neonatal plasma micronutrient levels. *Am J Perinatol* 1993;10:30-5

=====

Dobbing J (ed) Maternal Nutrition and Lactational Infertility- Raven Press, New Cork, 1985

Dowling DD, Romero RJ, Mitchell MD, Lundin-Schiller S. Isolation of multiple substances in amniotic fluid that regulate amnion prostaglandin E2 production: the effects of gestational age and labor. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 1991; 44(4):253-5.

Doyle LW, Rickards AL, Kelly EA y cols: Breastfeeding and intelligence, Lancet 1992; 339: 744-5.

Drotar D, Hack M, Taylor G, Schluchter M, Andreias L, Klein N. The impact of extremely low birth weight on the families of school-aged children. Pediatrics 2006; 117(6):2006-13

Ducsay CA, Cook MJ, Walsh SW, Novy MJ. Circadian patterns and dexamethasone-induced changes in uterine activity in pregnant rhesus monkeys. Am J Obstet Gynecol 1983; 145(4):389-96.

Dudley DJ. Pre-term labor: an intra-uterine inflammatory response syndrome? J Reprod Immunol 1997; 36(1-2):93-109.

Durante W, Kroll MH, Vanhoutte PM, Schafer AI. Endothelium-derived relaxing factor inhibits thrombin-induced platelet aggregation by inhibiting platelet phospholipase C. Blood 1992; 79(1):110-6.

Dutta-Roy AK. Placental transfer of long Chain polyunsaturated fatty acids. Prenatal and Neonatal Medicine 1997;2:101-107

Dvorakova M, Sivonova M, Trebaticka J et al. The effect of polyphenolic extract from pine bark, Pycnogenol on the level of glutathione in children suffering from attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). Redox Rep 2006; 11(4):163-72.

Edison RJ, Berg K, Remaley A. Adverse Birth Outcome Among Mothers With Low Serum Cholesterol. Pediatrics 2007; 120, 723 - 733,

Einarson A. Introduction: reproductive mental health--Motherisk update 2008. Can J Clin Pharmacol. 2009;16(1):1-5.

Emmett PM, Rogers IS. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. Early Hum Dev 1997; 49(Suppl):S7-S28.

Ergul Y, Erkan T, Uzun H, Genc H, Altug T, Erginoz E. The effect of vitamin C on the oxidative liver injury due to isoniazid in rats. Pediatr Int. 2009

Escames, G.; León, J.; Khaldy, H.; Bikjdaouene, L.; Román, E.; Galindo, R.; Acuña D. Bioquímica pineal. En: Muñoz, A. Melatonina: Realidad actual y posibilidades futuras en Pediatría. Ed. Formación Alcalá, 2002. 73.

Falcón M, Perez-Carceles MD, Luna A. Placental Cadmium and Lipid Peroxidation in Smoking Women Related to Newborn Anthropometric Measurements. *Archives of environmental contamination and toxicology* (2003) vol. 45, nº 2, 82—278

Fawzi W, Thomas C, Chalmers MD, Herrera G. Vitamin A supplementation and child mortality. *JAMA* 1993;269:898-903.

Ferreira IM. Quantification of non-protein nitrogen components of infant formulae and follow-up milks: comparison with cows' and human milk. *Br J Nutr.* 2003 Jul;90(1):127-33

Ferriero DM. Oxidant mechanisms in neonatal hypoxia-ischemia. *Dev Neurosci* 2001; 23(3):198-202.

Fewtrell MS, Morley R, Abbott RA et al. Double-blind, randomized trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation in formula fed to preterm infants. *Pediatrics* 2002; 110(1 Pt 1):73-82.

Fily A, Pierrat V, Delporte V, Breart G, Truffert P. Factors associated with neurodevelopmental outcome at 2 years after very preterm birth: the population-based Nord-Pas-de-Calais EPIPAGE cohort. *Pediatrics* 2006; 117(2):357-66. Notes: CORPORATE NAME: EPIPAGE Nord-Pas-de-Calais Study Group

Finer NN, Barrington KJ. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *Cochrane Database Syst Rev* 2006; (4):CD000399

Fitzgibbons SC, Ching Y, Yu D, Carpenter J, Kenny M, Weldon C, Lillehei C, Valim C, Horbar JD, Jaksic T. Mortality of necrotizing enterocolitis expressed by birth weight categories. *J Pediatr Surg.* 2009 Jun;44(6):1072-5; discussion 1075-6.

Flamant C, Lorino E, Nolent P et al. [Newborn infants supported by extracorporeal membrane oxygenation: survival and clinical outcome.]. *Arch Pediatr* 2007

Flitter, W.D. Free radical and myocardial reperfusion injury. *British Medical Bulletin* 1993;49(3):545-555.

Flynn A. Minerals and trace elements in milk. *Adv Food Nutr Res* 1992; 36:209-250.

Fogel I, Pinchuk I, Kupfermanc 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

Fogel I, Pinchuk I, Kupfermanc 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.

Frank L, Price LT, Whitney PL. Possible mechanism for late gestational development of the antioxidant enzymes in the fetal rat lung. *Biol Neonate* 1996; 70(2):116-27

Franke AA, Cluster LJ, Tanaka Y. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *Am J Clin Nutr* 1998;68(suppl):144-8.

Fridovich, I. *Free radicals in Biology*. Ed. Pryor. Academic Press, 1976. New York. Vol 1; 239.

Fridovich, I. Superoxide dismutase: An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol.Chem.* 1989;264:7761-7764.2

Friedman SA, Lubarsky SL, Ahokas RA, Nova A, Sibai BM. Preeclampsia and related disorders. Clinical aspects and relevance of endothelin and nitric oxide. *Clin Perinatol* 1995; 22(2):343-55.

Friel, J.K.; Martin, S.M.; Langdon, M.; Herzberg, G.R.; Buettner, G.R. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infants formulas. *Pediatr. Res.* 2002;51(5):612-618.

Gagné A, Wei SQ, Fraser WD, Julien P. Absorption, transport, and bioavailability of vitamin e and its role in pregnant women. *J Obstet Gynaecol Can.* 2009 Mar;31(3):210-7. Review

Garza C, Schanler RJ, Butte NF, Motil KJ. Special properties of human milk. *Clin Perinatol* 1987; 14:11-32.

Gaull GE. Taurine in pediatric nutrition: review and update. *Pediatrics* 1989; 83:433-442.

Gemma S, Vichi S, Testai E. Metabolic and genetic factors contributing to alcohol induced effects and fetal alcohol syndrome. *Neurosci Biobehav Rev* 2007; 31(2):221-9.

Genzel-Boroviczeny O, Wahle j, Koletzko B. Fatty acids composition of human milk during the 1<sup>st</sup> month after term and preterm delivery. *Eur. J. Pediatr.* 1997;156:142-7

Georgeson, G.D.; Szony, B.J.; Streitman, K.; et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2002;103(2):136-139.

Gericke GS. Reactive oxygen species and related haem pathway components as possible epigenetic modifiers in neurobehavioural pathology. *Med Hypotheses* 2006; 66(1):92-9

Ghafourifar P, Richter C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett* 1997; 418(3):291-6.

Gibbs RS, Romero R, Hillier SL, Eschenbach DA, Sweet RL. A review of premature birth and subclinical infection. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166(5):1515-28

Gil A, Gil M. Funciones de los ácidos grasos poliinsaturados y oleico durante la gestación, lactación y la infancia. En: Libro blanco de los omega-3. Ed. Puleva Food. Granada, 2002.

Gillin FD, Reiner DS, Gault MJ. Cholate-dependent killing of *Giardia lamblia* by human milk. *Infect Immunol* 1985; 47:619-622.

Golan H, Kashtuzki I, Hallak M, Sorokin Y, Huleihel M. Maternal hypoxia during pregnancy induces fetal neurodevelopmental brain damage: partial protection by magnesium sulfate. *J Neurosci Res* 2004; 78(3):430-41

Gomez AM. Estado nutricional de vitamina E y C en recién nacidos y madres como indicador de estrés oxidativo. Tesis para optar por el título de Master en Nutrición en Salud Pública, La Habana, Cuba, 2000

Gomez R, Ghezzi F, Romero R, Munoz H, Tolosa JE, Rojas I. Premature labor and intra-amniotic infection. Clinical aspects and role of the cytokines in diagnosis and pathophysiology. *Clin Perinatol* 1995; 22(2):281-342.

Gómez-Corvera A, Cerrillo I, Molinero P, Naranjo MC, Lardone PJ, Sanchez Hidalgo M, Carrascosa-Salmoral MP, Medrano-Campillo P, Guerrero JM, Rubio A. Evidence of immune system melatonin production by two pineal melatonin deficient mice, C57BL/6 and Swiss strains. *J Pineal Res.* 2009

Gómez Vida JM, Bayes García R, Molina Font JA. Estado nutricional materno-fetal de vitamina E. *An Esp Pediatr* 1992;36:197-200.

Gratacos E, Casals E, Deulofeu R et al. Serum and placental lipid peroxides in chronic hypertension during pregnancy with and without superimposed preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 1999; 18(2):139-46.

Greene HL. Vitamin intakes during rapid growth. En: Heird WC, ed. *Nutritional needs of the six to twelve month old infant*. New York: Carnation, 1991:251-67.

Gross SJ, Gabriel E. Vitamin E status in preterm infants fed human milk or infant formula. *J Pediatr.* 1985;106(4):635-9

Gudiel-Urbano M, Goñi I. Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Arch Latinoamer Nutr* 2001; 51(4):332-39.

Gulcan H, Ozturk IC, Arslan S. Alterations in antioxidant enzyme activities in cerebrospinal fluid related with severity of hypoxic ischemic encephalopathy in newborns. *Biol Neonate.* 2005;88(2):87-91. Epub 2005 Apr 4

=====

Gustafsson PA, Duchén K, Birberg U, Karlsson T. Breastfeeding, very long polyunsaturated fatty acids (PUFA) and IQ at 6 1/2 years of age *Acta Paediatr*. 2004 Oct;93(10):1280-7.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C.; Cross, C.E. Free radical, antioxidants, and human disease: where are we now?. *J. Labo. Clin. Med.* 1992. 119(6):598-620.

Hambraeus L (1977): Proprietary milk versus human breast. milk in infant feeding: a critical appraisal from the. nutritional point of view. *Pediatric Clin N Am* 1977;24:17-36

Hamosh M. Protective functions of proteins and lipids in human milk. *Biol Neonate* 1998; 74:163-176.

Handelman, G.J. Carotenoids as scavenger of active oxigens species. In: *Handbook of Antioxidants*. Packer, L. and Cadenas, E. Eds. 1991 Marcel Dekker, Inc. New York. 259-313

Hanna N., Ahmed K., Anwar M., Petrova A., Hiatt M., Hegyi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed.* 2004;89:F518–520

Hanning RM, Paes B, Atkinson SA. Protein metabolism and growth of term infants in response to a reducedprotein, 40:60 whey: casein formula with added triptophan. *Am J Clin Nutr* 1992; 56:1004-1011.

Hanson LA, Korotkova M, Lundin S et al. The transfer of immunity from mother to child *New York. Acad Sci* 2003; 987:199-206.

Hardeland, R.; Poeggeler, B.; Balzer, I.; Behrmann, G. In: *Crhronobiology and chronomedicine*. Gutenbrunner, C.; Hildebrandt, G.; Moog, R. (eds). Peter Landg, Frankfurt,1993; 113-120.

Harrison LC: Cow's milk and IDDM. *Lancet* 1996;348:905-6

Harzer G, Haug M, Bindels JG. Biochemistry of human milk in early lactation. *Z. Ernahrungswiss* 1986; 25:77-90.

Harzer G, Haug M, Dieterich I, Gentner PR. Changing patterns of human milk lipids in course of lactation and during the day. *Am J Clin Nutr* 1983; 37:612-21

Hasnain BI, Mooradian AD. Recent trials of antioxidant therapy: what should we be telling our patients?. *Cleve Clin J Med.* 2004 Apr;71(4):327-34. Review.

Heine RG, Hill DJ, Hosking CS: Primary prevention of atopis dermatitis in breastfed infants: Whats the evidence? *J Pediatr* 2004;144:602-7

Heine WE, Klein PD, Reeds PJ. The importance of alpha-lactalbumin in infant nutrition. *J Nutr* 1991; 121: 277-283.

Heinig MJ, Dewey KG. Health effects of breast feeding for mothers: a critical review. *Nut Res Rev.* 1997;10:59-63

Helland IB, Smith L, Saarem K, Saugstad OD, Drevon CA. Maternal supplementation with very-long-chain n-3 fatty acids during pregnancy and lactation augments children's IQ at 4 years of age. *Pediatrics.* 2003 Jan;111(1):e39-44

Hendricks KM, Badruddin SH. Weaning recommendations: the scientific basis. *Nutr Rev* 1992; 50:125-133.

Hennart PF, Brasseur DJ, Delogne-Desnoeck JB, et al. Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin. A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutritional status, prolactin status, and parity of mother. *Am J Clin Nutr* 1991; 53:32-39.

Henry MC, Moss LR. Necrotizing Enterocolitis. *Annu Rev Med.* 2008 Sep 25.

Homedes N, Ugalde A. ¿Qué sabemos del cumplimiento de los tratamientos médicos en el tercer mundo? *Bol Of Sanit Panam* 1994; 116:491-517

Hong J, Park EA, Kim YJ, Lee HY, Park BH. Association of antioxidant vitamins and oxidative stress levels in pregnancy with infant growth during the first year of life. *Public Health Nutrition* 2007;11(10), 998–1005

Howlader MZ, Parveen S, Tamanna S, Khan TA, Begum FJ. Oxidative Stress and Antioxidant Status in Neonates Born to Pre-eclamptic Mother. *Trop Pediatr.* 2009 Apr.

Huang MJ, Kua KE, Teng HC, Tang KS, Weng HW, Huang CS. Risk factors for severe hyperbilirubinemia in neonates. *Pediatr Res.* 2004 Nov;56(5):682-9

Humphrey JH, West KP Jr, Sommer A. Vitamin A deficiency and attributable mortality among under 5 year olds. *Bull World Health Organ* 1992;70:225-32.

Hurrell RF, Lynch SR, Trinidad TP, Dassenko SA, Cook, JD. Iron absorption in humans influenced by bovine milk proteins. *Am J Clin Nutr* 1989; 49:546-552.

Hylander M.A., Strobino D.M., Pezzullo J.C., Dhanireddy R. Association of human milk feedings with a reduction in retinopathy of prematurity among very low birthweight infants. *J. Perinatol.* 2001;21:356–362

Inder T.E., Volpe J.J. Mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol.* 2000;5:3–16

Innis SM. Human milk and formula fatty acids. *J Pediatr* 1992;120:S56-S51

International Vitamin A Consultative Group. El uso inocuo de vitamina A por la mujer durante la edad reproductiva. Washington DC.: The Nutrition Foundation, 1985:23

Ivarsson A, Hernell O, Stenlund Hy cols: Breast-feeding protects against celiac disease. *Am J Clin Nutr* 2002;75:914-21

Jackson, R.M. Pulmonary oxygen toxicity. *Chest* 1985;88:900-905.

Jacobson SW, Jacobson JL, Sokol RJ, Chiodo LM, Corobana R. Maternal age, alcohol abuse history, and quality of parenting as moderators of the effects of prenatal alcohol exposure on 7.5-year intellectual function. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28(11):1732-45.

Jacobson SW, Jacobson **JL**: Breastfeeding and intelligence. *Lancet* 1992;339: 926.

Jacobson SW, Jacobson JL: Breastfeeding and IQ:Evaluation of socio-environmental confounders. *Acta Paediatr* 2002;91:258-66

Jelliffe DB, Jellife EF. Volume and composition of human milk in poorly nourished communities. A review. *Am J Clin Nutr* 1978; 31:492-515.

Jelliffe-Pawlowski LL, Hansen RL. Neurodevelopmental outcome at 8 months and 4 years among infants born full-term small-for-gestational-age. *J Perinatol* 2004; 24(8):505-14.

Jensen RG, Bitman J, Carlson S y cols: Milk lipids. A. Human Milk Lipids. En: RG Jensen (ed) *Handbook of milk composition*, Academic Press, San Diego 1995:495-575.

Jensen RG. Lipids in human milk. *Lipids* 1999; 34:1243-1271.

Jensen, RG. *Handbook of Milk Composition*. Academic Press San Diego, CA.,1995

Johnson L., Schaffer D., Quinn G., Goldstein D., Mathis M.J., Otis C., Boggs T.R. Jr. Vitamin E supplementation and the retinopathy of prematurity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1982;**393**:473-495

Kadoma Y, Ishihara M, Okada N, Fujisawa S. Free radical interaction between vitamin E (alpha-, beta-, gamma- and delta-tocopherol), ascorbate and flavonoids. *In Vivo*. 2006 Nov-Dec;20(6B):823-7

Kaempf DE, Miki M, Ogihara T, Okamoto R, Konishi K, Mino M. Assessment of vitamina E nutritional status in neonates, infants and children-on the basis of alpha-tocopherol levels in blood components and mucosal cells. *Intern J Vit Nutr Res* 1994;64:185-91.

Kagan, V.E.; Nohl, H.; Quim, P.L. Coenzyme Q: Its role in scavenging and generation of radicals in membranes. In: *Handbook of Antioxidants*. . Packer, L. and Cadenas, E. Eds. 1991 Marcel Dekker, Inc. New York. 157-201.

Kamath U, Rao G, Raghothama C, Rai L, Rao P. Erythrocyte indicators of oxidative stress in gestational diabetes. *Acta Paediatr* 1998; 87(6):676-9.

Kamei M, Fujita T, Kanbe T, Sasaki K, Oshiba K, Otani S, Matsui-Yuasa I, Morisawa S. The distribution and content of ubiquinone in foods. *Internat J Vit Nutr Res* 1985;56:57-63.

Kang JH, Cook NR, Manson JE, Buring JE, Albert CM, Grodstein F. Vitamin E, vitamin C, beta carotene, and cognitive function among women with or at risk of cardiovascular disease: The Women's Antioxidant and Cardiovascular Study. *Circulation*. 2009;119(21):2772-80.

Kanofsky, J.P.; Sigma,P. Singlet oxygen production from reactions of ozone with biological molecules. *J. Biol. Chem.* 1991;266:9039-9042.

Karmaus W, Dobai AL, Ogbuanu I, Arshard SH, Matthews S, Ewart S. Long-term effects of breastfeeding, maternal smoking during pregnancy, and recurrent lower respiratory tract infections on asthma in children. *J Asthma*. 2008 Oct;45(8):688-95

Karowicz-Bilinska A, Kowalska-Koprek U, Suzin J, Sieroszewski P. [Total antioxidative activity measured by ABTS method in pregnant women treated with L-arginine for IUGR]. *Ginekol Pol* 2003; 74(10):1130-6.

Kaya H, Oral B, Dittrich R, Ozkaya O. Lipid peroxidation in umbilical arterial blood at birth: the effects of breech delivery. *BJOG* 2000; 107(8):982-6.

Kedziora-Kornatowska K, Szewczyk-Golec K, Czuczejko J, Pawluk H, van Marke de Lumen K, Kozakiewicz M, Bartosz G, Kedziora J. Antioxidative effects of melatonin administration in elderly primary essential hypertension patients. *J Pineal Res*. 2008 Oct;45(3):312-7. Epub 2008 Mar 25.

Kelly, F.J.; Lubec, G. Hyperoxic injury of immature guinea pig lung is mediated with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* 2001;107:642-647.

Kidd PM. Omega-3 DHA and EPA for cognition, behavior, and mood: clinical findings and structural-functional synergies with cell membrane phospholipids. *Altern Med Rev*. 2007 Sep;12(3):207-27. Review

Kilbride HW, Thorstad K, Daily DK. Preschool outcome of less than 801-gram preterm infants compared with full-term siblings. *Pediatrics* 2004; 113(4):742-7.

Kinalska M, Sledziewski A, Telejko B, Kowalska I, Kretowski A, Kinalska I. [Evaluation of lipid peroxidation and acid-base status in cord blood of newborns after diabetes in pregnancy]. *Przegl Lek* 2001; 58(3):120-3

KIRSCHBAUM TH. Variability of magnitude of the Bohr effect in human fetal blood. *J Appl Physiol* 1963; 18:729-33

=====  
Klaus M, Jeraud J, Kreger W y cols: Maternal attachment: Importance of the first post-partum days. *N Engl J Med* 1972; 286:460-3

Klement E, Cohen RV, boxean J y cols: Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: Asistematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2004;80:1342-52.

Kramer M, Szöke K et al: The effect of different factors on the composition of human milk and its variations. III Effect on dietary fats on the lipid composition of human milk. *Nutr Diet* 7:71, 1965

Krebs NF, Reindinger CJ, Hartley S, Robertson AD, Hambidge KM. Zinc supplementation during lactation: effects on maternal status and milk zinc concentrations. *Am J Clin Nutr* 1995; 61:1030-6.

Krebs NF. Zinc supplementation during lactation. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(Suppl):509S-12S

Kulak W, Sobaniec W, Solowej E, Sobaniec H. Antioxidant enzymes and lipid peroxides in children with cerebral palsy. *Life Sci* 2005; 77(24):3031-6

Kunz C, Rodríguez-Palmero M, Koletzko B, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk, Part I: General aspects, proteins, and carbohydrates. *Clin Perinatol* 1999; 26:307-33.

Kunz, C; Rudloff, S; Baier, W; Klein, N; Strobel, S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Annu. Rev. Nutr.* 2000;20:699-722

Kurlak LO, Stephenson TJ,. Plausible explanations for effects of long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) on neonates. *Arch. Dis. Child Neonatal*, 1999;88:F148-F154

Kuzela A, Stifter C, Worobey J: Breastfeeding and mother-infant interactions, *J Reproductive Psychol* 1990; 8:185-194

Lahtinen SJ, Boyle RJ, Kivivuori S, Oppedisano F, Smith KR, Robins-Browne R, Salminen SJ, Tang ML. Prenatal probiotic administration can influence Bifidobacterium microbiota development in infants at high risk of allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2009 Feb;123(2):499-501

Lainez Villabona B, Bergel Ayllon E, Cafferata Thompson ML, Belizan Chiesa JM. [Early or late umbilical cord clamping? A systematic review of the literature]. *An Pediatr (Barc)* 2005; 63(1):14-21.

Lammi-Keefe CJ. D. Vitamins D and E in human milk. En: Jensen RG (Ed). *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press, 1995; 706-717.

Lapinsky SE, Mehta S. Activated protein C for preeclampsia: tailoring the disease to the therapy. *Crit Care Med* 2002; 30(8):1929-30.

Lau C. Development of oral feeding skills in the preterm infant. Arch Pediatr 2007; Sep;14 Suppl 1:S35-41

Lawrence, RA, Lawrence, RM. Breastfeeding. A Guide for the Medical Profession 6<sup>o</sup> ed. Elsevier Mosby, 2007; 277-81

Leung AK, Ghang KW. Iron deficiency anaemia. Adv Pediatr. 2001; 48: 385-408

Li, X.; Pan, M.; Zhuang, Y.; Liu, W. Effects of fetal anoxia and acidosis on superoxide dismutase. Zhonghua. Fu. Chan. Ke. Za. Zhi. 2002;37(4):205-207

Liebler, D.C. The role of metabolism in the antioxidant function of vitamin E. Crit. Rev. Toxicol. 1993;23:147-169.

Lien EL. Infant formulas with increased concentrations of alpha-lactalbumin. Am J Clin Nutr 2003; 77(Suppl):1555S-1558S.

Lin HJ, Huang CC, Hsu KS. Effects of neonatal dexamethasone treatment on hippocampal synaptic function. Ann Neurol 2006; 59(6):939-51

Lineamientos para la Alimentación del Niño Menor de 2 Años, Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, 1998.

Litarru, G. P. Energy and defense. Facts and perspective on coenzyme Q10 in biology and medicine. Casa Editrice Scientifica Internazionali. Roma 1994.

Little RE, Gladen BC. Levels of lipid peroxides in uncomplicated pregnancy: a review of the literature. Reprod Toxicol 1999; 13(5):347-52.

Litvinenko, L.A.; Danilova, L.A.; Shabalov, N.P. Changes in the system of antioxidant blood defence in newborns with different pathology. Vopr. Med. Khim. 2002;48(5):513-518.

Lloyd JK. The importance of vitamin E in Human Nutrition. Acta Paediatr Scand 1990;79:6-11.

Locke R: Preventing obesity: the breast milk-leptin connection. Acta Paediatr 2002;91:891-6.

Lodge CJ, Lowe AJ, Dharmage SC. Is reverse causation responsible for the link between duration of breastfeeding and childhood asthma. Am J Respir Crit Care Med, 2008 Nov 1;178(9):994

Lönnerdal B, Atkinson S: Nitrogenous components of **milk**. A. Human Milk Proteins. En: RG Jensen (ed) Handbook of Milk Composition. Academia Press, San Diego 1995: 351-68.

Lonnerdal B. Biochemistry and physiological functions of human milk proteins. Am J Clin Nutr 1985; 42:1299-1317.

Lonnerdal B. Copper nutrition during infancy and childhood. *Am J Clin Nutr* 1998; (Suppl); 67:1046S-53S.

Lonnerdal B. Effects of maternal dietary intake on human milk composition. *J Nutr* 1986; 116:499-513.

Lonnerdal B. Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiol Rev* 1997; 77:643-669.

Lonnerdal B. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 2003; 77(Suppl):1537S- 1543S

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120(3):227-37.

Lozoff B, Jimenez E, Wolf AW. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *New Eng J Med* 1991; 325:687-694.

Lucas A, Morley R, Cole TJ y cols: Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet* 1992; 339: 261-4.

Lucas A., Cole T.J. Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet*. 1990;**336**:1519–1523

Lyell DJ, Lambert-Messerlian GM, Giudice LC. Prenatal screening, epidemiology, diagnosis, and management of preeclampsia. *Clin Lab Med* 2003; 23(2):413-42.

Machlin, L.J. Vitamin E. In: Handbook of Antioxidants. Packer, L. and Cadenas E. Eds. 1991 Marcel Dekker, Inc. New York. 99-144.

Macias C, Schweigert FJ. Changes in the Concentration of Carotenoids, Vitamin A, Alpha-Tocopherol and Total Lipids in Human Milk throughout Early Lactation. *Annals of Nutrition & Metabolism* 2001;45:82-85

Mahadik SP, Pillai A, Joshi S, Foster A. Prevention of oxidative stress-mediated neuropathology and improved clinical outcome by adjunctive use of a combination of antioxidants and omega-3 fatty acids in schizophrenia. *Int Rev Psychiatry* 2006; 18(2):119-31.

Mahalanabis D. Breast feeding and vitamin A deficiency among children attending a diarrhoea in Bangladesh: a case control study. *Br Med J* 1991;303:493-6.

Mak IT, Weglicki WB. Antioxidant activity of calcium channel bloking drugs. *Methods in Enzymology*. Academic Press, New York, 1994:620-630.

Many A, Hubel CA, Roberts JM. Hyperuricemia and xanthine oxidase in preeclampsia, revisited. *Am J Obstet Gynecol* 1996; 174(1 Pt 1):288-91.

Mardones F, Fanta E, Paris E. Lactancia materna, pediatría. 4<sup>ta</sup> ed. Santiago de Chile: Mediterráneo, 1991; 178-184.

Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268(17):12231-4.

Maroz A, Anderson RF, Smith RA, Murphy MP. Reactivity of ubiquinone and ubiquinol with superoxide and the hydroperoxyl radical: implications for in vivo antioxidant activity. *Free Radic Biol Med*. 2009 Jan 1;46(1):105-9. Epub 2008 Oct 14

Marschik PB, Einspieler C, Garzarolli B, Pechtl HF. Events at early development: are they associated with early word production and neurodevelopmental abilities at the preschool age? *Early Hum Dev* 2007; 83(2):107-14.

Martínez-Cruz, F.; Pozo, D.; Osuna, C., Espinar, A.; Marchante, C.; Guerrero, J.M. Oxidative stress induced by phenylketonuria in the rat: Prevention by melatonin, vitamin E, and vitamin C. *J. Neurosci. Res.*2002;69(4):550-558.

Mataix J, Lopez-Frías M. Lactación. En: *Nutrición y Alimentación Humana* (2<sup>a</sup> Edición). Ed Ergón, Madrid, 2008

Mataix J, Mañas M, Llopis J, Martinez-Victoria E. *Food and Health. Software.* Asde Alimentación S.A., Valencia, Spain. 2003.

Mataix J, Quiles JL, Rodriguez, J,. Aporte de grasa. En *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías Alimentarias para la población española*, 231-237. Madrid, 2001b

Mataix J, Quiles JL. Aceites y grasas. En: *Sociedad Española de Nutrición Comunitaria. Guías Alimentarias para la población española*,121-131. Madrid, 2001a

Mataix J. *Libro blanco de los Omega-3.* Ed. Puleva Food. Granada, 2002.

Mataix J. *Tablas de composición de Alimentos Españoles* 4<sup>a</sup> edicion. Ed. Universidad de Granada, 2004.

Mataix, J.; Mañas, M.; Quiles, J. Et al. Coenzyme Q content depends upon oxidative stress and dietary fat unsaturation. *Mol. Aspects. Med.* 1997;18:129S-135S.

Mataix J, Ochoa JJ, Quiles JL. Olive oil and mitochondrial oxidative stress. *Int J Vitam Nutr Res.* 2006 Jul;76(4):178-83. Review

Mattila P, Kumpulainen J. Coenzymes Q9 and Q10: Contents in foods and dietary intake. *J. Food Comp Anal* 2001;14:409-417.

Maunu J, Ekholm E, Parkkola R et al. Antenatal Doppler measurements and

=====  
early brain injury in very low birth weight infants. *J Pediatr* 2007; 150(1):51-6.e1.  
Notes: CORPORATE NAME: PIPARI Study Group

Maxwell SRJ, Jakeman P, Thomason H, et al. Changes in plasma antioxidant status during eccentric exercise and the effect of vitamin supplementation. *Free Radic Res Commun* 1993;19:191-202

Maxwell SRJ. Prospects for the use of antioxidant therapies. *Drugs*,1995; 49:345-61

Mayer EJ, Hamman RF, Gay EC y cols: Reduced risk of IDDM among breast fed children. The Colorado IDDM Registry. *Diabetes* 1988;37:1625-32.

Mc Neilly AS, Lactational amenorrhea. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1993;10:35-56

McCain GC. An evidence-based guideline for introducing oral feeding to healthy preterm infants. *Neonatal Netw*, 2003; 22(5):45-50

McCord, J.M. Free radical and heart disease. In: Somogy, J.C.; Muller, H.R. Eds. *Nutritional Impact of Food Processing*. Bibli. Nutr. Dieta.1989; Basel. Karger. 43:327-337.

McNamara JP. Role and Regulation of Adipose Tissue Metabolism During Lactation. *J. Nutr. Biochem*, 1995;6:120-9

Mecocci P, Polidori MC, Troyano I, Cherbuni A, Ceccehett R, Pini G,

Melton LJ, Bryant SC, Wahner HW et al. Influence of breastfeeding and other reproductive factors on bone mass later in life. *Osteoporosis Int*. 1993;3:76-83.

Mena P, Milad M. Variaciones en la composición nutricional de la leche materna. Algunos aspectos de importancia clínica. *Rev Chil Pediatr* 1998; 69:116-121.

Mercer JS, Vohr BR, McGrath MM, Padbury JF, Wallach M, Oh W. Delayed cord clamping in very preterm infants reduces the incidence of intraventricular hemorrhage and late-onset sepsis: a randomized, controlled trial. *Pediatrics* 2006; 117(4):1235-42.

Mestan KK, Marks JD, Hecox K, Huo D, Schreiber MD. Neurodevelopmental outcomes of premature infants treated with inhaled nitric oxide. *N Engl J Med* 2005; 353(1):23-32.

Migliore-Samour D, Jolles P. Casein: a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia* 1988; 44:188-193.

Mikkola K, Ritari N, Tommiska V et al. Neurodevelopmental outcome at 5 years of age of a national cohort of extremely low birth weight infants who were born in 1996-1997. *Pediatrics* 2005; 116(6):1391-400

Mitmesser SH, Jensen CL. Roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in the term infant: developmental benefits. *Neonatal Netw.* 2007 Jul-Aug;26(4):229-34. Review

Mizuno K, Mizuno N, Shinohara T y cols: Mother-infant skin to skin contact after delivery results in early recognition of own mother's milk odour. *Acta Paediatr* 2004; 93:1640-5

Molina, A.; Muñoz, A.; Uberos, J.; Contreras, F. Patología por radicales libres en Pediatría. En: Muñoz, A. Melatonina: Realidad actual y posibilidades futuras en Pediatría. Ed. Formación Alcalá, 2002. 625-6.

Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21(4):361-74

Monte, M.; Sacerdote de Lusting, E. Radicales libres del oxígeno y superóxido dismutasas: Aspectos biológicos y médicos. *Medicina (Buenos Aires)* 1994;54:61-68.

Moreland J, Coombs J. Promoting and Supporting Breastfeeding. *Am Fam Physician* 2000; 61: 2093-2100, 2103-2104

Muñoz Calvo MT, Hidalgo Vicario MI, Clemente Pollán J. Pediatría extrahospitalaria. Aspectos básicos en Atención Primaria. 4ª edición Ed Ergón, Madrid 2008; 16:91-103

Murrell,G.A.C.; Francis,M.J.O.; Bromley,L. Modulation of fibroblast proliferation by oxygen Free radicals. *Biochem. J.* 1990;265:659-665.

Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Greer IA, Lyall F. Endothelial nitric oxide synthase in placental villous tissue from normal, pre-eclamptic and intrauterine growth restricted pregnancies. *Hum Reprod* 1997; 12(1):167-72.

Myatt L, Eis AL, Brockman DE, Kossenjans W, Greer IA, Lyall F. Differential localization of superoxide dismutase isoforms in placental villous tissue of normotensive, pre-eclamptic, and intrauterine growth-restricted pregnancies. *J Histochem Cytochem* 1997; 45(10):1433-8.

Myatt L, Rosenfield RB, Eis AL, Brockman DE, Greer I, Lyall F. Nitrotyrosine residues in placenta. Evidence of peroxynitrite formation and action. *Hypertension* 1996; 28(3):488-93.

Nagaoka S, Kakiuchi T, Ohara K, Mukai K. Kinetics of the reaction by which natural vitamin E is regenerated by vitamin C. *Chem Phys Lipids.* 2007 Mar;146(1):26-32.

Nagel HT, de Haan TR, Vandenbussche FP, Oepkes D, Walther FJ. Long-term outcome after fetal transfusion for hydrops associated with parvovirus B19 infection. *Obstet Gynecol* 2007; 109(1):42-7

=====  
National Academy of Sciences. Nutrition during lactation. Subcommittee on Nutrition During Lactation. Committee on Nutritional Status During Pregnancy and Lactation. Food and Nutrition Board. Institute of Medicine.. Washington, D.C.: National Academy Press, 1991.

Neerhof MG. Causes of intrauterine growth restriction. *Clin Perinatol* 1995; 22(2):375-85.

Nelson S, Lerner E, Needlman R, Salvator A, Singer LT. Cocaine, anemia, and neurodevelopmental outcomes in children: a longitudinal study. *J Dev Behav Pediatr* 2004; 25(1):1-9.

Nevado Jiménez, A. Valoración del papel antioxidante de la melatonina frente a la intoxicación por adriamicina. Estudio a nivel de hepatocito y eritrocito en ratas wistar (tesis doctoral). 2001; 3-91.

Neville MC. Secretion and composition of human milk. En: Hay WW Jr. Neonatal nutrition and metabolism. St. Louis: Mosby 1991; 260-279

Newburg DS, Neubauer SH. Carbohidrates in milks: Analysis, Quantities and significance. En: Jensen RG (ed) Handbook of milk composition. Academic Press, San Diego 1995:273-349

Newburg, DS. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2000;30:S8–S17

Newcomb PA, Egan KM, Titus-Ernstoff et al, Lactation in relation to posmenopausal breast cancer. *Am J Epidemiol*, 1999;150(2):174-82

Newman V. Vitamin A and breastfeeding: A comparison of data from developed and developing countries. San Diego, Wellstart International, 1993.

Niemelä A, Järvenpää A-L: Is breastfeeding beneficial and maternal smoking harmful to the cognitive development of children? *Acta Paediatr*, 1996;85:1202-6

Nieto, N. Perfil lipídico y defensa antioxidante del corazón de ratas alimentadas con diferentes dietas lipídicas. Memoria de licenciatura, 1993. Universidad de Granada. Facultad de Farmacia.

Niki, E.  $\alpha$ - tocoferol. In: Handbook of Antioxidants. Packer, L. and Cadenas, E. Eds. 1995. Marcel Dekker, Inc. New York.. 3-25.

Ochoa JJ, Muñoz-Hoyos A. a-tocopherol and surgical stress. En: Preddy VR, Watson R, eds. The encyclopedia of Vitamin E. Oxfordshire: CABI Publishing; 2007; 397-406.

Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL *et al*. Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72 h of life. *Free Radic Res* 2003; 37(3):317-22

Ochoa JJ, Ramírez-Tortosa MC. a-tocopherol and antioxidant status in premature infants. En: Preddy VR, Watson R, eds. The encyclopedia of Vitamin E. Oxfordshire: CABI Publishing; 2007; 493-501.

Ochoa, J.J.; Ramírez, M.C.; Quiles, J.L.; Palomino, N.; Robles, R.; Mataix, J.; Huertas, J.R. Oxidative stress in erythrocytes from prematures and full-term infants during their first 72 h of life. *Free. Radic. Res.* 2003;37(3):317-322.

Ochoa JJ, Quiles JL, Huertas JR, Mataix J. Coenzyme Q10 protects from aging-related oxidative stress and improves mitochondrial function in heart of rats fed a polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich diet. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2005 Aug;60(8):970-5.

Ochoa JJ, Quiles JL, López-Frías M, Huertas JR, Mataix J. Effect of lifelong coenzyme Q10 supplementation on age-related oxidative stress and mitochondrial function in liver and skeletal muscle of rats fed on a polyunsaturated fatty acid (PUFA)-rich diet. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2007 Nov;62(11):1211-8.

O'Donnell A, Carmuega E. Recomendaciones para la alimentación de niños normales menores de 6 años. Publicación CESNI # 12, 1996.

O'Donovan Donough J; Fernandes Caraciolo J. Free radicals and diseases in premature infants. *Antioxid. Redox Signal*, 2004;6,169-176.

Ogra PL. Human milk and breast feeding: an update on the state of the art. *Pediatr Res* 1982; 16:266-271.

Okolo SN, Onwuanaku C, Okonji M, VanderJagt DJ, Millson M, Churchwell C, Glew RH. Concentration of eight trace minerals in milk and sera of mother-infant pairs in Northern Nigeria. *J Trop Pediatr* 2000; 46:160-2.

Organización Mundial de la Salud. 54<sup>a</sup> Asamblea Mundial de la Salud. Estrategia mundial para la alimentación del lactante y del niño pequeño. Duración óptima de la lactancia materna exclusiva. A54/INF:DOC:/4. Mayo 2001.

Ortega RM, Andrés P, Martínez RM, López-Sobaler AM, Quintas ME. Zinc levels in maternal milk: the influence of nutritional status with respect to zinc during the third trimester of pregnancy. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51:253-8.

Ortega RM, Martínez RM, Quintas ME, López-Sobaler AM, Andrews P. Calcium levels in maternal milk: relationships with calcium intake during the third trimester of pregnancy. *Br J Nutr* 1998; 79:501-507.

Orvig, C.; Thompson, K.H.; Battell, M.; McNeill, J.H. Vanadium compounds as insulin mimics. In: Sigel, H.; Sigel, A. (eds): Vanadium and its role in life. 73 ed. Dekker, New York, 1995:575-593.

Oski F. Iron deficiency in infancy and childhood. *N Engl J Med*,1993;329:190-93

O'Tierney PF, Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, Eriksson JG. Duration of breast-feeding and adiposity in adult life. *J Nutr*, 2009;139(2):422S-5S

Owen CG, Whincup PH, Kaye SJ, Martin RM, Davey Smith G, Cook DG, Bergstrom E, Black S, Wadsworth ME, Fall CH, Freudenheim JL, Nie J, Huxley RR, Kolacek S, Leeson CP, Pearce MS, Raitakari OT, Lisinen I, Viikari JS, Ravelli AC, Rudnicka AR, Strachan DP, Williams SM. Does initial breastfeeding lead to lower blood cholesterol in adult life? A quantitative review of the evidence. *Am J Clin Nutr*. 2008 Aug;88(2):305-14. Review. Erratum in: *Am J Clin Nutr*. 2008 Dec;88(6):1707.

P de, Holmberg H, Jakobson K y cols: A study of promoting and inhibiting lactation. *Dev Med Child Neurol* 1977; 19:575-84

Packer L, Fuchs J, eds. *Vitamin C in health and Disease*. New York: Marcel Dekker; 1997.

Palmer FB. Strategies for the early diagnosis of cerebral palsy. *J Pediatr* 2004; 145(2 Suppl):S8-S11.

Papp A., Nemeth I., Karg E., Papp E. Glutathione status in retinopathy of prematurity. *Free Radic. Biol. Med.* 1999;27:738-743

Peterson JA, Patton S, Hamosh M. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol Neonate* 1998; 74:143-162.

Peuchant E, Brun JL, Rigalleau V et al. Oxidative and antioxidative status in pregnant women with either gestational or type 1 diabetes. *Clin Biochem* 2004; 37(4):293-8.

Pierce, M.R.; Bancalari, E. The role of inflammation in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia. *Pediatr Pulm* 1995;19:371-378.

Pinelli J, Saigal S, Atkinson SA. Effect of breastmilk consumption on neurodevelopmental outcomes at 6 and 12 months of age in VLBW infants. *Adv Neonatal Care* 2003; 3(2):76-87.

Pita ML, Giron MD, Perez-Ayala M, DeLucchi C, Martinez Valverde A, Gil A. Effects of postnatal age and diet on the fatty acid composition of plasma lipid fractions in preterm infants. *Clin Physiol Biochem* 1989; 7(5):238-48.

Pita ML, Morales J, Sanchez-Pozo A, Martinez-Valverde JA, Gil A. Influence of the mother's weight and socioeconomic status on the fatty acid composition of human milk. *Ann Nutr Metab* 1985; 29(6):366-73.

Place I, Englert Y. A prospective longitudinal study of the physical, psychomotor, and intellectual development of singleton children up to 5 years who were conceived by intracytoplasmic sperm injection compared with children

conceived spontaneously and by in vitro fertilization. *Fertil Steril* 2003; 80(6):1388-97

Poiffait A, Adrian J. Composition minérale du lait de femme: 2- Oligoéléments. *Médecine et Nutrition* 1994; 30:63-71.

Poiffait A, Adrian J. Composition minérale du lait maternel: 1- Macro-éléments. *Médecine et Nutrition* 1993; 29:163-171.

Portela MLPM de. *Vitaminas y minerales en nutrición*. 2ª ed. Buenos Aires: La Prensa Médica Argentina, 2003.

Prentice A, Jarjou LM, Cole TJ, Stirling DM, Dibba B, Fairweather-Tait S. Calcium requirements of lactating Gambian mothers: effects of a calcium supplement of breastmilk calcium concentration, maternal bone mineral content, and urinary calcium excretion. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:58-67.

Prentice A. Constituents of human milk. *Food and Nutr Bull* 1996; 17:305-315.

Prentice A. Maternal calcium requirements during pregnancy and lactation. *Am J Clin Nutr* 1994; 59S:477-83.

Prentice A. Regional variations in the composition of human milk. En: Jensen RG (Ed). *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press, 1995:115-221

Pyska W, Klejewski A, Karolkiewicz J, Szczesniak L, Szczesniak-Chmielecka A, Nowak A. [Imbalance of pro-oxidants-antioxidants in blood of pregnant women with pregnancy induced hypertension]. *Ginekol Pol* 2002; 73(1):14-8.

Quiles JL, Huertas JR, Mañas M, Ochoa JJ, Battino M, Mataix J. Oxidative stress induced by exercise and dietary fat modulates the coenzyme Q and vitamin A balance between plasma and mitochondria. *Int J Vitam Nutr Res*. 1999 Jul;69(4):243-9

Quiles JL, Ochoa JJ, Battino M, Gutierrez-Rios P, Nepomuceno EA, Frías ML, Huertas JR, Mataix J. Life-long supplementation with a low dosage of coenzyme Q10 in the rat: effects on antioxidant status and DNA damage. *Biofactors*. 2005;25(1-4):73-86.

Quiles JL, Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Linde J, Bompadre S, Battino M, Narbona E, Maldonado J, Mataix J. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res*. 2006 Feb;40(2):199-206

Raboei EH. Necrotizing enterocolitis in full-term neonates: is it aganglionosis? *Eur J Pediatr Surg*. 2009 Apr;19(2):101-4. Epub 2009 Apr 9.

Raju T.N., Langenberg P., Bhutani V., Quinn G.E. Vitamin E prophylaxis to reduce retinopathy of prematurity: a reappraisal of published trials. *J. Pediatr.* 1997;**131**:844–850

Ramirez-Tortosa MC, Granados S, Ramirez-Tortosa CL, Ochoa JJ, Camacho P, García-Valdés L, Battino M, Quiles JL. Oxidative stress status in liver mitochondria and lymphocyte DNA damage of atherosclerotic rabbits supplemented with water soluble coenzyme Q10. *Biofactors.* 2008;**32**(1-4):263-73.

Ramon, J.R. *Protocolos: Radicales libres y antioxidantes en clínica humana.* Editorial IDEPSA 1993.

Rankin JH, McLaughlin MK. The regulation of the placental blood flows. *J Dev Physiol* 1979; 1(1):3-30.

Rathmathullath L. Reduced mortality among children in southern India receiving a small weekly dose of vitamin A. *N Engl J Med* 1990;**323**:929-37

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

Reedy EA. The discovery of retrolental fibroplasia and the role of oxygen: a historical review, 1942-1956. *Neonatal Netw.* 2004 Mar-Apr;**23**(2):31-8.

Reiter, R.J. Pineal melatonin: Cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* 1991;**12**:11-180.

Reiter, R.J.; Guerrero, J.M.; García, J.J.; Acuña-Castroviejo, D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage, and aging. Relation to melatonin. *Biochem. Pharmacol.* 1998;**56**(10):1265-1272.

Revenis, M.E.; Kaliner, M.A. Lactoferrin and lysozyme deficiency in airway secretions: association with the development of bronchopulmonary dysplasia. *J Pediatr* 1992;**121**:262-270.

Ripalda MJ, Rudolph N, Wong SL. Developmental patterns of antioxidant defense mechanisms in human erythrocytes. *Pediatr Res* 1989; **26**(4):366-9

Rivero Urgell M, Santamaría Orleans A, Rodríguez-Palmero Seuma M. The importance of functional ingredients in pediatric milk formulas and cereals. *Nutr Hosp.* 2005 Mar-Apr;**20**(2):135-46. Review. Spanish

Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet* 2001; **357**(9249):53-6.

Robles R., Palomino N., Robles A. Oxidative stress in the neonate. *Early Hum. Dev.* 2001;**65**:S75–81.

Rodrigo R, Parra M, Bosco C et al. Pathophysiological basis for the prophylaxis of preeclampsia through early supplementation with antioxidant vitamins. *Pharmacol Ther* 2005; 107(2):177-97.

Rodríguez-Palmero M, Koletzko B, Kunz C, Jensen R. Nutritional and biochemical properties of human milk: II. Lipids, micronutrients, and bioactive factors. *Clin Perinatol* 1999; 26:335-59.

Rogers IS, Emmett P, Holding J. The growth and nutritional status of the breast-fed infant. *Early Hum Dev* 1997; 49(Suppl):S157-S174.

Rogers MS, Mongelli JM, Tsang KH, Wang CC, Law KP. Lipid peroxidation in cord blood at birth: the effect of labour. *Br J Obstet Gynaecol* 1998; 105(7):739-44.

Rojas Hidalgo E. *Vitaminas y acción antioxidante*. Ed Merck. 1996

Romero R, Baumann P, Gomez R et al. The relationship between spontaneous rupture of membranes, labor, and microbial invasion of the amniotic cavity and amniotic fluid concentrations of prostaglandins and thromboxane B2 in term pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168(6 Pt 1):1654-64; discussion 1664-8.

Romero-Alvira, C.; González Martínez, F. Estrés oxidativo y su relación con la patología pediátrica. *An. Esp. Pediatr.* 1992;36(2):85-97.

Ronayne de Ferrer P. Leche humana: I. Composición nutricional (actualización). *Arch Argent Pediatr* 1993; 91:158-164

Ronayne de Ferrer P. Leche humana: II. Factores que modifican su volumen y composición. *Arch Argent Pediatr* 1993; 91:239-245.

Ronayne de Ferrer PA, Sambucetti ME. Casein to whey protein ratio in rat and human milks: effects of maternal protein intake. *J Dairy Sci* 1993; 76:1645-1653.

Ronayne de Ferrer PA. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la alimentación del lactante. *Arch Argent Pediatr* 2000; 98:231-238.

Rosenblatt KA, Thomas DB. The WHO collaborative study of neoplasia and steroid contraceptives. *Int J Epidemiol* 1993;22:192-7

Rumbold A, Crowther CA. Vitamin E supplementation in pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev.* 2005 Apr 18;(2):CD004069. Review.

Russell, G.A.B. Antioxidants and neonatal lung disease. *Eur J Pediatr* 1995;153:S36-41.

Saarinen UM, Kajosaari M: Breastfeeding as prophylaxis against atopic disease: prospective follow up study until 17 years old. *Lancet* 1995;346:1065-69

Salmenpera L, Perheentupa J, Nanto V, Siimes MA. Low zinc intake during exclusive breast-feeding does not impair growth. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1994; 18:361-370.

Sanders TAB, Reddy S. The influence of a vegetarian diet on the fatty acid composition of human milk and the essential fatty acid status of the infant. *J. Pediatr* 1992;120:S71-7

Sangeetha RK, Bhaskar N, Baskaran V. Comparative effects of beta-carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Mol Cell Biochem.* 2009 May 7.

Saugstad O.D. Mechanisms of tissue injury by oxygen radicals: implications for neonatal disease. *Acta. Paediatr.* 1996;85:1-4

Saugstad OD. Resuscitation of newborn infants with room air or oxygen. *Semin Neonatol* 2001; 6(3):233-9.

Saugstad OD. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2001; 13(2):147-53.

Scaiano, J.C. Exploratory laser flash photolysis study of free radical reactions and magnetic field effects in melatonin chemistry. *J. Pineal. Res.* 1995;19:189-195.

Schanler RJ. Human milk for preterm infants: nutritional and immune factors. *Semin Perinatol* 1989; 13:69-77.

Schell JD Jr, Budinsky RA, Wernke MJ. PCBs and neurodevelopmental effects in Michigan children: an evaluation of exposure and dose characterization. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001; 33(3):300-12.

Schiza V, Giapros V, Pantou K, Theocharis P, Challa A, Andronikou S. Serum transferrin receptor, ferritin, and reticulocyte maturity indices during the first year of life in 'large' preterm infants. *Eur J Haematol.* 2007 Nov;79(5):439-46

Schnitzer E, Pinchuk I, Bor A, Leikin-Frenkel A, Lichtenberg D. Oxidation of liposomal cholesterol and its effect on phospholipid peroxidation. *Chem Phys Lipids* 2007; 146(1):43-53

Schock B.C., Sweet D.G., Halliday H.L., Young I.S., Ennis M. Oxidative stress in lavage fluid of preterm infants at risk of chronic lung disease. *Am. J. Physiol. Lung Cell Physiol.* 2001;281:L1386-L1391.

Sevanian,A.; Hochstein,P. Mechanisms and consequence of lipid peroxidation in biological systems. *Ann.Rev.Nutr.* 2006:365-390.

Sharda B. Free radicals: emerging challenge in environmental health research in childhood and neonatal disorders. *Int J Environ Res Public Health*. 2006 Sep;3(3):286-91

Simko M, Blazicek P, Holoman K et al. [Changes in serum levels of lipid peroxidation products during labor and in the puerperium]. *Ceska Gynekol* 2002; 67(1):15-9.

Singh SK, Dua T, Tandon A, Kumari S, Ray G, Batra S. Status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in hypoxic ischemic encephalopathy. *Indian Pediatr*. 1999 Jun;36(6):561-6

Sladek SM, Kanbour-Shakir A, Watkins S, Berghorn KA, Hoffman GE, Roberts JM. Granulated metrial gland cells contain nitric oxide synthases during pregnancy in the rat. *Placenta* 1998; 19(1):55-65.

Sofi F et al. Adherencia a una dieta mediterránea y estado de salud: meta-análisis. *BMJ* 2003 (11 septiembre); 337: 1344

Sommer A. Vitamin A, infectious disease, and childhood mortality: a 2 cts. solution? *J Infec Dis* 1993;167:1003-7

Sosa R, Kennel JH, Klaus M y cols: The effect of early mother-infant contact on breastfeeding, infection and growth. En: *Breastfeeding and the Mother*. Ciba Foundation Symposium 45, Elsevier, Amsterdam 1976

Steiner H, Zahradnik HP, Hillemanns HG, Breckwoldt M. Treatment of delayed labour with prostaglandin E2 (author's transl). *Geburtshilfe Frauenheilkd* 1977; 37(6):495-9.

Straatman M, Monti D, Stahl W, Sies H, Franceschi C, Senin U. Plasma antioxidants and longevity: A study on healthy centenarians. *Free Rad. Biol. Med.* 2000; 28: 1243-1248.

Stubbe, J. Ribonucleotide reductase; amazing and confusing. *J. Biol. Chem.* 1990;265:5329-5332.

Sullivan, J.L.; Newton, R.B.; Serum antioxidant activity in neonates. *Arch Dis Child* 1988;63:748-750.

Suresh, G.K.; Davis, J.M.; Soll, R.F. Superoxide dismutase for preventing chronic lung disease in mechanically ventilated preterm infants. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* 2001;(1):CD001968.

Takser L, Mergler D, Hellier G, Sahuquillo J, Huel G. Manganese, monoamine metabolite levels at birth, and child psychomotor development. *Neurotoxicology* 2003; 24(4-5):667-74

Tan, D.X.; Poeggeler, B.; Reiter, R.J.; Chen, S.; Manchester, L.C.; Barlow-Walden, L.R. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett.* 1993;70:65-71.

Tang N, He M, O'Riordan MA et al. Ethanol inhibits L1 cell adhesion molecule activation of mitogen-activated protein kinases. *J Neurochem* 2006; 96(5):1480-90.

Tastekin A, Ors R, Demircan B, Saricam Z, Ingec M, Akcay F. Oxidative stress in infants born to preeclamptic mothers. *Pediatr Int* 2005; 47(6):658-62

Taylor RN, Musci TJ, Kuhn RW, Roberts JM. Partial characterization of a novel growth factor from the blood of women with preeclampsia. *J Clin Endocrinol Metab* 1990; 70(5):1285-91.

Temboury MC. Composición de la leche humana. En: *Lactancia Materna: Guía para profesionales*. Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. Monografías de la AEP, N° 5. Ed Ergón. Madrid, 2004

Temma K, Shimoya K, Zhang Q et al. Effects of 4-hydroxy-2-nonenal, a marker of oxidative stress, on the cyclooxygenase-2 of human placenta in chorioamnionitis. *Mol Hum Reprod* 2004; 10(3):167-71

Torbati, D.; Wafapoor, H.; Peyman, G.A. Hyperbaric oxygen tolerance in newborn mammals-hypothesis on mechanisms and outcome. *Free Radic Biol Med* 1993;14:695-703.

Toschke AM, Vignerova J, Lhotaska L y cols: Overweight and obesity in 6 to 14 year old Czech children in 1991: Protective effect of breastfeeding. *J Pediatr* 2002;141:764-9.

Traystman RJ, Kirsch JR, Koehler RC. Oxygen radical mechanisms of brain injury following ischemia and reperfusion. *J Appl Physiol* 1991; 71(4):1185-95.

Turoli D., Testolin G., Zanini R., Bellu R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta. Paediatr.* 2004;93:1569-1574

Tyson J, Burchfield J, Sentence F, Mize C, Uauy R, Eastburn J. Adaptation of feeding to a low fat yield in breast milk. *Pediatrics* 1992; 89:215-220.

Uauy R, Birch D, Birch E, Tyson JE. and Hoffman D.. Effect of dietary omega-3 fatty acids on retinol function of very low-birthweight neonates. *Pediatric Research*,1990; 28: 485-492.

Uauy R, Birch E, Birch D. Visual and brain function measurements in study of n-3 fatty acid requirements Of infants. *Journal of Pediatrics*,1992;120: 168-180.

Uauy R, Mena P, Rojas C. Essential fatty acids in early life: structural and funcional role. *Proceedings of the Nutrition Society.* 2000; 59: 3-15.

Uauy R. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J Nutr* 1994; 124:157S-159S.

Uauy R; Castillo C. Lipid Requirements of Infants: Implications for Nutrient Composition of Fortified Complementary Foods. *J Nutr*, 2003;133: 2962-2972.

Underwood B. Was the "anti-infective" vitamin misnamed? *Nutr Rev* 1994;52:140-3.

Ursini, F.; Maiorino, M.; Valente, M.; Ferri, L.; Gregolin, C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1982;710:197-211.

Vaarala O, Paronen J, Otonkoski T y col: Cow milk feeding induces antibodies to insulin en children: a link between cow milk and insulin-dependent diabetes mellitus? *Scand J Immunol* 1998;47:131-5

Valenzuela A, Sanhueza J, Garrido A. Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids: When and why it is necessary to supplement with these fatty acids. *A&G* 1999; 50: 294-299

van Rheenen PF, Gruschke S, Brabin BJ. Delayed umbilical cord clamping for reducing anaemia in low birthweight infants: implications for developing countries. *Ann Trop Paediatr* 2006; 26(3):157-67.

Vennemann MM, Bajanowski T, Brinkmann B, Jorch G, Yücesan K, Sauerland C, Mitchell EA and the GeSID Study Group. Does breastfeeding reduce the risk of sudden infant death syndrome? *Pediatrics.* 2009 Mar;123(3):406-10.

Vento M., Asensi M., Sastre J., Lloret A., Garcia-Sala F., Vina J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J. Pediatr.* 2003;142:240–246

Verster GC. Melatonin and its agonists, circadian rhythms and psychiatry. *Afr J Psychiatry (Johannesbg).* 2009 Feb;12(1):42-6.

Villacampa MJ, Casaus C, Grande F. Composición en ácidos grasos del calostro y leche humana en España. *An Esp Pediatr* 1982; 16:324-55

Vohr B.R., Poindexter B.B., Dusick A.M., Mckinley L.T., Wright L.L., Langer J.C., Poole W.K., NICHD Neonatal Research Network. Beneficial effects of breast milk in the neonatal intensive care unit on the developmental outcome of extremely low birth weight infants at 18 months of age. *Pediatrics.* 2006;118:e115–123

Volpe J.J. Brain injury in the premature infant from pathogenesis to prevention. *Brain Dev.* 1997;19:519–534

Von Dadelszen P, Magee LA, Lee SK et al. Activated protein C in normal human pregnancy and pregnancies complicated by severe preeclampsia: a therapeutic opportunity? *Crit Care Med* 2002; 30(8):1883-92.

Von Kries R, Koletzko B, Sauerwald T y cols: Breast feeding and obesity: cross sectional study. *BMJ* 1999;319:147-50

Walsh SW, Wang Y, Jesse R. Peroxide induces vasoconstriction in the human placenta by stimulating thromboxane. *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(4):1007-12.

Wang, Z.; Ciabattoni, G.; Creminon, C.; Lawson, J.; Fitzgerald G.A.; Patrono, C.; Maclouf, J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;275:94-100

Ward MJ, Pauliny J, Lipper EG, Bussel JB. Long-term effects of fetal and neonatal alloimmune thrombocytopenia and its antenatal treatment on the medical and developmental outcomes of affected children. *Am J Perinatol* 2006; 23(8):487-92.

Warner JO. Pediatric Allergy and Immunology is gaining in strength and profile. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009 Feb;20(1):3-4

Warren, CD; Chaturvedi, P; Newburg, AR; Oftedal, OT; Tilden, CD; Newburg, DS. Comparison of oligosaccharides in milk specimens from humans and twelve other species. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2001;501:325–332

Warshaw, J.B.; Wilson, C.W.; Saito, K.; Prough R.A. The responses of glutathione and antioxidant enzymes to hyperoxia in developing lung. *Pediatr Res* 1985;19:819-823.

Weinman AR, Jorge SM, Martins AR, de Assis MG, Martinez FE, Camelo JS Jr. Assessment of vitamin A nutritional status in newborn preterm infants. *Nutrition.* 2007 Jun;23(6):454-60. Epub 2007 May 17.

West KP Jr, Chirambo M, Katz J, Sommer A. Breast feeding weaning patterns and the risk of xerophthalmia in southern Malawi. *Am J Clin Nutr* 1986;44:690-7.

West KP, Pokhrel RP, Katz J. Efficacy of vitamin A in reducing preschool child mortality in Nepal. *Lancet* 1991;338:67-71.

Wildschut J, Feron FJ, Hendriksen JG et al. Acid-base status at birth, spontaneous motor behaviour at term and 3 months and neurodevelopmental outcome at age 4 years in full-term infants. *Early Hum Dev* 2005; 81(6):535-44.

Winterbourn, C.C. Free Radical Toxicology and Antioxidant Defense. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995;22:877-880.

Wong DM, Vo DT, Alcott CJ, Stewart AJ, Peterson AD, Sponseller BA, Hsu WH. Adrenocorticotrophic hormone stimulation tests in healthy foals from birth to 12 weeks of age. *Can J Vet Res.* 2009 Jan;73(1):65-72.

Woods JR Jr. Reactive oxygen species and preterm premature rupture of membranes-a review. *Placenta* 2001; 22 Suppl A:S38-44.

Wuhl E, Kogan J, Zurowska A et al. Neurodevelopmental deficits in Pierson (microcoria-congenital nephrosis) syndrome. *Am J Med Genet A* 2007; 143(4):311-9.

Xanthou M. Immune protection of human milk. *Biol Neonate* 1998; 74:121-133.

Yallampalli C, Byam-Smith M, Nelson SO, Garfield RE. Steroid hormones modulate the production of nitric oxide and cGMP in the rat uterus. *Endocrinology* 1994; 134(4):1971-4.

Yeo CL, Chan C. Motor development of very low birthweight infants with chronic lung disease - a comparative study. *Ann Acad Med Singapore* 2005;34(7):411-6

Yeomans ER, Hauth JC, Gilstrap LC 3rd, Strickland DM. Umbilical cord pH, PCO<sub>2</sub>, and bicarbonate following uncomplicated term vaginal deliveries. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 151(6):798-800

Zaken V, Kohen R, Ornoy A. Vitamins C and E improve rat embryonic antioxidant defense mechanism in diabetic culture medium. *Teratology* 2001; 64(1):33-44.

Zani A, Cordischi L, Cananzi M, De Coppi P, Smith VV, Eaton S, Pierro A. Assessment of a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis. *Eur J Pediatr Surg.* 2008 Dec;18(6):423-6. Epub 2008 Nov 14.

Zhang J, Stanley RA, Melton LD. Lipid peroxidation inhibition capacity assay for antioxidants based on liposomal membranes *Mol Nutr Food Res.* 2006 Aug;50(8):714-24

Zhou BY, Lu GJ, Huang YQ, Ye ZZ, Han YK. Efficacy of hyperbaric oxygen therapy under different pressures on neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2008 Apr;10(2):133-5

Zhou Y., Wang Q., Evers B.M., Chung D.H. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr. Res.* 2005;58:1192-1197.

Ziegler JW, Ivy DD, Kinsella JP, Abman SH. The role of nitric oxide, endothelin, and prostaglandins in the transition of the pulmonary circulation. *Clin Perinatol* 1995; 22(2):387-403

Zoroglu SS, Yurekli M, Meram I et al. Pathophysiological role of nitric oxide and adrenomedullin in autism. *Cell Biochem Funct* 2003; 21(1):55-60.