

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Medicina

Curso 2020-2021



**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON
ARÁNDANOS EN EL ESTADO OXIDATIVO DE
LA LECHE EN MADRES SANAS**

Facultad de Ciencias de la Salud

Universitat Jaume I

Autora: Clara Alarcón Guzmán

Tutores: María Muriach Saurí y Pablo Baliño Remiro

Unidad predepartamental de Medicina. Área de Fisiología

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ARÁNDANOS EN EL ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE EN MADRES SANAS



TRABAJO DE FIN DE GRADO (TFG) - MEDICINA

EL/LA PROFESOR/A TUTOR/A hace constar su AUTORIZACIÓN para la Defensa Pública del Trabajo de Fin de Grado y CERTIFICA que el/la estudiante lo ha desarrollado a lo largo de 6 créditos ECTS (150 horas)

TÍTULO del TFG:

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ARÁNDANOS EN EL ESTADO
OXIDATIVO DE LA LECHE EN MADRES SANAS

ALUMNO/A: Clara Alarcón Guzmán

DNI: 74389637R

PROFESOR/A TUTOR/A: Maria Muriach Sauri

MARIA EDDA | Firmado digitalmente
MURIACH | por MARIA EDDA |
SAURI | MURIACH|SAURI
Fecha: 2021.06.02
11:05:19 +02'00'

Fdo (Tutor/a):

COTUTOR/A INTERNO/A (Sólo en casos en que el/la Tutor/a no sea profesor/a de la Titulación de Medicina):

Fdo (CoTutor/a interno):

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
ÍNDICE DE TABLAS.....	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	6
1. RESUMEN	7
2. ABSTRACT	8
3. EXTENDED SUMMARY	9
4. INTRODUCCIÓN	11
4.1. JUSTIFICACIÓN	11
4.2. METABOLISMO OXIDATIVO	11
4.3. RADICAL LIBRE Y ESPECIE REACTIVA	11
4.3.1. DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS	12
4.4. ANTIOXIDANTES	13
4.4.1. PAPEL DE LA DIETA EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE	15
4.5. ESTRÉS OXIDATIVO	15
4.5.1. ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA	16
4.5.2. ALIMENTACIÓN DURANTE LA LACTANCIA.....	17
4.6. LECHE MATERNA.....	18
4.6.1. COMPOSICIÓN	18
4.6.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE MATERNA ..	20
4.7. PROPIEDADES NUTRITIVAS Y ANTIOXIDANTES DE LOS ARÁNDANOS.....	20
5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	21
6. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1. REACTIVOS	22
6.2. SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA.....	22
6.3. EQUIPOS.....	23
6.4. TIPO DE ESTUDIO	23
6.5. POBLACIÓN DE ESTUDIO	24
6.6. TAMAÑO MUESTRAL	24
6.7. REQUERIMIENTOS ÉTICOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO.....	24
6.8. SEGUIMIENTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS	25
6.9. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS A ANALIZAR	26
6.9.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL	26
6.9.2. DETERMINACIÓN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE.....	27
6.9.3. DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO	30

6.10.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	30
7.	RESULTADOS	31
7.1.	DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE.....	31
7.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES	32
7.2.1.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES	32
7.2.2.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUTATIÓN (GSH).....	33
7.3.	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILO EN PROTEÍNAS.....	35
8.	DISCUSIÓN	36
9.	CONCLUSIONES.....	39
10.	BIBLIOGRAFÍA	40
11.	ANEXOS.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. *Síntesis del sistema glutatión.*

Figura 2. *Modificación del equilibrio entre los antioxidantes y las especies reactivas del oxígeno.*

Figura 3. *Concentración de CAT en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.*

Figura 4. *Concentración de polifenoles totales en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.*

Figura 5. *Concentración de GSH en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.*

Figura 6. *Concentración de GSH en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.*

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. *Principales especies reactivas del oxígeno.*

Tabla 2. *Valor nutricional de los arándanos marca "Hacendado" de Mercadona.*

Tabla 3. *CAT medida con el método ABTS en la leche de los dos grupos de madres al inicio al final del estudio. Los resultados están expuestos en media \pm error estándar.*

Tabla 4. *Significancia de los valores de CAT a lo largo del tiempo y de su efecto con la interacción del grupo.*

Tabla 5. *Concentración de polifenoles totales medida en los dos grupos de madres al inicio al final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expuestos en media \pm error estándar.*

Tabla 6. *Significancia de los valores de polifenoles totales a lo largo del tiempo y de su efecto con la interacción del grupo.*

Tabla 7. *Contenido de grupos carbonilo en leche medido en los dos grupos de madres al inicio al final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expuestos en media \pm error estándar.*

Tabla 8. *Significancia de los valores de GC totales a lo largo del tiempo y de su efecto con la interacción del grupo.*

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6 sal diamónica del ácido sulfónico
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CAT	Capacidad antioxidante total
CAT/SOD	Catalasa-superóxido dismutasa
DNFB	1-fluoro-2,4-dinitrobenceno
DNFH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EtOH	Etanol
GC	Grupos carbonilo
GPx	Glutación peroxidasa
GRd	Glutación reductasa
GSH	Glutación
GSSH	Glutación oxidado
HAc	Ácido acético
HC	Hidratos de carbono
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IAA	Ácido iodoacético
MDA	Malonaldehído
MeOH	Metanol
NaAc	Sodio anhidro
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCA	Ácido perclórico
RLs	Radicales libres
RN	Recién nacido
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SOD	Superóxido dismutasa
TEAC	Trolox equivalent antioxidant capacity

1. RESUMEN

Antecedentes

Ya desde el periodo intrauterino debemos hacer frente al estrés oxidativo y son numerosos los estudios que demuestran que la leche materna juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis oxidativa en el recién nacido. Hoy en día sabemos que la dieta materna influye en el estado oxidativo de la leche y, a pesar de ello, no existe apenas evidencia sobre la importancia del aporte antioxidante de la leche de madres sanas y mucho menos sobre su relación con la dieta materna, de ahí que nuestro objetivo sea estudiar la variación que pudiera sufrir el estado oxidativo de la leche humana si la madre suplementaba su dieta con un fruto rico en antioxidantes como es el arándano.

Métodos

Planteamos un diseño de grupo control y de intervención en el que sólo un grupo recibiría la suplementación, con un tamaño muestral de 22 madres. En ambos grupos se analizó en la leche la capacidad antioxidante total, el contenido en grupos carbonilo como marcador de daño oxidativo y dos antioxidantes (polifenoles y glutatión) al inicio del estudio y tras los 21 días de suplementación dietética.

Resultados

En lo que se refiere al efecto del tiempo, los resultados fueron estadísticamente significativos en la capacidad antioxidante total. Con respecto al efecto de la suplementación, no obtuvimos resultados estadísticamente significativos para ninguno de los parámetros.

Conclusiones

Los resultados obtenidos han demostrado que la suplementación de la dieta con arándanos no modifica el estado oxidativo de la leche de madres sanas dado que no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos en ninguno de los parámetros analizados.

PALABRAS CLAVE: “estrés oxidativo”, “antioxidantes”, “lactancia”, “arándanos”, “dieta”.

2. ABSTRACT

Background

Neonatal period is well-known to increase the oxidative stress and there is overwhelming evidence for human milk providing antioxidative protection in the newborn. Nowadays we know that maternal diet has an influence on oxidative state of human milk, however, there is sparse evidence about antioxidant supply of human milk in healthy mothers and even less about their relation with maternal dietary, this is why the aim of this study is to assess if the maternal diet supplementation with an antioxidant-rich fruit such as cranberries affects the oxidative state of human milk.

Methods

With a sample-size of 22 mothers, we proposed a design including control group and intervention group where only one group would receive supplementation. We measured levels of total antioxidant capacity, carbonyl group content as an oxidative damage marker and two antioxidants (polyphenols and glutation) in milk of both groups at the beginning of the study and after 21 days.

Results

According to the effect of time, results were statistically significant for total antioxidant capacity. Regarding to cranberries supplementation effect, no statistically significant results were found for any of the parameters.

Conclusion

Due to the results found in this is study, we conclude that diet supplementation with cranberries does not modify oxidatve status of healthy women milk.

Key words: “oxidative stress”, “antioxidants”, “breastfeeding”, “cranberries”, “diet”.

3. EXTENDED SUMMARY

Introduction

Oxidative metabolism has been extensively studied by the scientific community. This system is required by anaerobic organisms to produce energy but, as a consequence, chemical substances such as free radicals and reactive oxygen species are inevitably produced and can be highly reactive and lead to oxidative damage if there is an excess. Biological systems have developed a network of antioxidants to maintain redox balance.

When the oxidative damage surpasses the antioxidant defence oxidative stress occurs. Oxidative stress is implicated in many pathologies, but also in physiological situations like pregnancy and labour. Therefore, neonatal period is an oxidative challenge for both the mother and her progeny. Due to breastfeeding, the mother provides a complex antioxidant system through her milk that helps in maintaining REDOX balance in the newborn in a period where he suffers from an immature antioxidant system, as the human milk is a source of numerous antioxidant substances that contribute to its high antioxidant capacity. Among those substances we find polyphenols and GSH and others.

It is widely reported that maternal diet influences the oxidative state of human milk and the importance of ensuring an adequate intake of certain nutrients is well considered, but there is weak evidence about antioxidant intake in this population group and even less about the influence in oxidative status of their milk.

Cranberries are considered as one of the highest sources of natural antioxidants with a high content in polyphenols, this is why they seem an appropriate option to enhance oxidative status of human milk.

Objectives

The main objective is to study if the maternal diet supplementation with an antioxidant-rich fruit such as cranberries affects the oxidative state of human milk.

Methods

This is an planned, observational and experimental study that belongs to a major project with an initial sample of 60 mother that was reduced to 22 mothers. Selection criteria were based in healthy women with healthy newborns that consult pediatrics for post-natal monitoring and breastfeeding support between January 2017 and December 2017.

We planned a desing containing a control group and an intervention group where only one group would receive supplementation. We evaluated the total antioxidant capacity, carbonyl group content as an oxidative damage marker and two antioxidants (polyphenols and glutation) in milk of both groups at the beginning of the study and after the 21 days of diet supplementation.

A first descriptive analysis was carried out and afterwards, we proceeded with the inferential analysis using the SPSS Statistics program.

Results

Analyzing all the data, it was observed a higher total antioxidant capacity increase in the intervention group comparing to the control group, but differences were not statistically significant. According to total content of polyphenols, this content increases in both groups after 21 days, being this increase bigger in the group that was supplemented. However, statistical analysis shows that this difference is not statistically significant in comparison with the milk of the mothers of the control group. Regarding to glutation content, an increasing was observed in both groups after 21 days, being this increase higher in the control group, but the differences were not statistically significant. Finally, concerning to carbonyl groups, their content increases in both groups after 21 days, being this increase higher in the control group, which may confirm cranberries antioxidant power. However, those differences between groups were not statistically significant.

Conclusions

Regarding to the effect of maternal diet supplementation with cranberries on oxidative status of breast milk we conclude that there is not a significant improvment given the absence of statistically significant results.

4. INTRODUCCIÓN

4.1. JUSTIFICACIÓN

Ya desde el nacimiento debemos lidiar con la amenaza de la oxidación. Es necesario un estricto control que evite una situación de estrés oxidativo, pues derivado de este estrés pueden producirse daños a biomoléculas y alteraciones de funciones que participan en el envejecimiento celular y en la génesis de enfermedades en la edad adulta. La leche materna juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis oxidativa en las primeras épocas de la vida mediante el aporte de sistemas antioxidantes. Estos sistemas son un conjunto de diversos compuestos, algunos de los cuales necesitan ser repuestos por vía exógena mediante la alimentación. Asimismo, la composición de la leche materna varía en relación a su dieta. Los arándanos son frutos muy ricos en polifenoles y están considerados como una de las mayores fuentes de antioxidantes naturales. No existe apenas literatura sobre los efectos de la ingesta de arándanos en la mujer durante la lactancia. Por lo tanto, se plantea explorar la posibilidad de mejorar la capacidad y el contenido antioxidante de la leche humana mediante la adición de arándanos a la dieta materna habitual.

4.2. METABOLISMO OXIDATIVO

El oxígeno es un elemento indispensable para la vida, pues mediante el metabolismo oxidativo los organismos aerobios son capaces de llevar a cabo los procesos metabólicos vitales. Este tipo de metabolismo se basa en un conjunto de reacciones donde el O_2 actúa como aceptor final de electrones, generándose una elevada eficiencia energética. (1)

No obstante, derivado de estas reacciones se generan sustancias que pueden resultar potencialmente tóxicas y que pueden inducir el daño oxidativo y, en consecuencia, el estrés oxidativo. Estas sustancias son los radicales libres (RLs) y especies reactivas del oxígeno (ROS), entre otras.(2)

4.3. RADICAL LIBRE Y ESPECIE REACTIVA

El concepto de radical libre se define como toda aquella molécula o átomo que presenta un electrón desapareado en el orbital más externo de su estructura atómica, volviéndose así altamente inestable y, por tanto, muy reactivo.

La mayoría de los radicales libres proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno. Junto con los derivados del nitrógeno son los de mayor importancia biológica y pertenecen a lo que denominamos especies reactivas del oxígeno (ROS) (3). Así pues, las ROS incluyen tanto a los

radicales libres derivados del oxígeno, como a los no radicales que siguen siendo moléculas muy reactivas (como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso).

Tabla 1. Principales especies reactivas del oxígeno.

Radicales	ROS	Anión superóxido	O ₂ •-
		Radical Hidroxilo	OH•
		Radical alcoxilo	RO•
		Peroxilo	ROO•
	NOS	Óxido Nítrico	NO•
No Radicales	ROS	Peróxido de Hidrógeno	H ₂ O ₂
		Oxígeno singlete	¹ O ₂
	NOS	Peroxinitrito	ONOO-

4.3.1. DAÑO OXIDATIVO A BIOMOLÉCULAS

Aunque los RLs y ROS pueden oxidar cualquier tipo de biomolécula, sus principales dianas son los lípidos, las proteínas, los glúcidos y los ácidos nucleicos (4).

4.3.1.1. DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS

La oxidación o peroxidación lipídica afecta especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados y, en consecuencia, puede alterar la permeabilidad de la membrana celular. Ocurre habitualmente cuando el radical hidroxilo (•OH) se genera cerca de los fosfolípidos de membrana y ataca a estos ácidos grasos poliinsaturados. Esto genera unos productos denominados hidroxiperóxidos que son altamente inestables y que reaccionan entre ellos, pudiéndose producir nuevos RLs en una reacción en cadena que aumenta la propagación del daño oxidativo. Entre los diferentes hidroperóxidos que se producen en la peroxidación, destaca el malondialdehído (MDA) al haber sido ampliamente estudiado y al haber sido aceptado por la comunidad científica como un buen marcador de la peroxidación de lípidos (4,5).

4.3.1.2. DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS

Puede haber oxidación de todos los aminoácidos de las proteínas, sobre todo a nivel de grupos carbonilo. Dicha oxidación provoca cambios en su estructura terciaria o cuaternaria con la consiguiente modificación o pérdida de función biológica. No todas las proteínas son igual de susceptibles a la oxidación, cabe destacar que aquellas que contienen metionina y cisteína son particularmente sensibles a la oxidación. El marcador utilizado para medir la oxidación de las proteínas son los grupos carbonilos (GC) derivados de este proceso (6).

4.3.1.3. DAÑO OXIDATIVO A GLÚCIDOS

El daño oxidativo a glúcidos adquiere importancia cuando se trata de polisacáridos de función estructural, ya que estos son despolimerizados por los RLs dando lugar a procesos degenerativos (7).

4.3.1.4. DAÑO OXIDATIVO A ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (ADN)

El oxígeno es capaz de adicionarse a las bases del ADN formándose el radical peroxilo. Las posteriores reacciones de estas especies radicales sobre el ADN dan lugar a un gran número de productos (4).

4.4. ANTIOXIDANTES

El concepto de antioxidante se define como cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo sufrido por una molécula diana (1).

En condiciones normales se mantiene un equilibrio en lo que respecta a la producción de RLs con la defensa antioxidante del organismo, aunque no es un equilibrio perfecto y existen daños oxidativos constantemente. Así pues, el organismo posee mecanismos para tratar de mantener un equilibrio REDOX que en conjunto se denominan “sistema antioxidante”. Este sistema compone de un grupo de compuestos moleculares, sistemas enzimáticos y compuestos antioxidantes y pro-antioxidantes que controlan el equilibrio REDOX a nivel celular, retrasando, previniendo o eliminando el daño oxidativo causado a una molécula diana (8).

En cuanto a su clasificación, desde un punto de vista fisiológico distinguimos los antioxidantes primarios (previenen la formación de nuevos radicales), secundarios (actúan cuando existe una superproducción de RLs y los sistemas enzimáticos están desbordados) y terciarios (reparan las biomoléculas dañadas por los RLs).

Por otra parte, se clasifican desde un punto de vista bioquímico:

- **Antioxidantes enzimáticos:**

- Glutación peroxidasa (GPx): es esencial para mantener la integridad y la función de las membranas al ser indispensable en la detoxificación del peróxido de hidrógeno y de los peróxidos lipídicos. Es la responsable de catalizar la reducción del peróxido de hidrógeno y los hidroxiperóxidos orgánicos hasta agua y alcohol, utilizando como donador de electrones al glutatión reducido (GSH).

- Catalasa: es abundante en el organismo humano. Tiene dos funciones básicas: catalítica y peroxidativa y pertenece al sistema antioxidante catalasa-superóxido dismutasa (CAT/SOD) que obra en condiciones de alta concentración de peróxido de hidrógeno (4).
 - Superóxido dismutasa (SOD): cataliza la reacción de dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno, que podrá volver a ser reducido por la catalasa o por la glutatión peroxidasa.
- **Antioxidantes no enzimáticos o “scavengers” de radicales libres:**
 - Glutatión (GSH): es considerada como la molécula antioxidante endógena más importante. El glutatión junto con las enzimas relacionadas con su metabolismo conforman el sistema glutatión (9). Más allá de participar en procesos fisiológicos como la síntesis de ADN o la detoxificación de xenobióticos, tiene un papel significativo como antioxidante al ser capaz de estabilizar radicales libres como el hidroxilo, el superóxido y los peróxidos, de manera directa o mediante la glutatión peroxidasa. El glutatión se puede encontrar reducido en la mayoría de los casos u oxidado (GSSG). Así pues, cuando se produce una agresión oxidativa, el GSH se oxida a GSSG por medio de una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa. El GSSG formado se reduce rápidamente a GSH gracias a la glutatión reductasa (GRd) que, a su vez, es dependiente de NADPH.

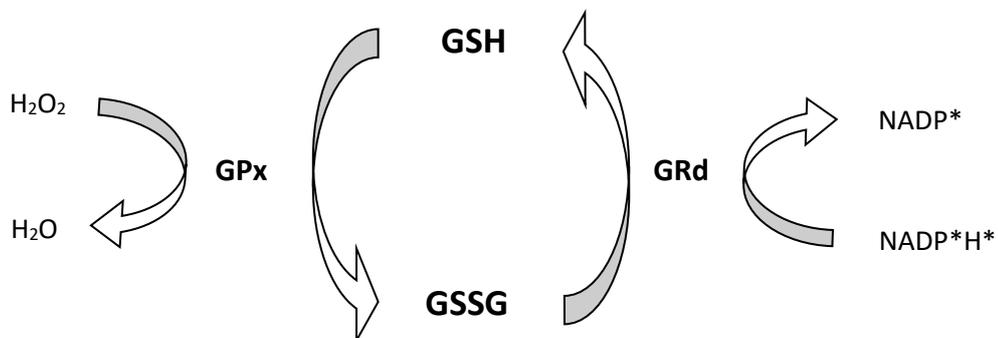


Figura 1. Síntesis del sistema glutatión.

- Vitamina E: es considerado el antioxidante natural más potente. Tiene especial importancia en el mantenimiento de la integridad de las membranas por su papel en la inhibición de la peroxidación lipídica. Es capaz de desactivar el radical el radical peroxilo dando como producto hidroperóxidos y radical tocoperoxilo, que son nuevamente reducidos por el ácido ascórbico.

- Vitamina C o ácido ascórbico: es un potente antioxidante capaz de reaccionar con numerosos RL, oxidándose a dehidroascorbato y siendo posteriormente reducido de nuevo a ácido ascórbico por la dehidroascorbato reductasa, para lo que se requerirá el glutatión.
- Polifenoles: dentro de este grupo los que poseen mayor capacidad antioxidante son los flavonoides. Su capacidad antioxidante se debe a su estructura química, la cual le permite captar fácilmente RLs, así como de su papel como quelantes de hierro y cobre, impidiendo la formación del radical hidroxilo (10).
- Carotenoides: su acción antioxidante se debe a su riqueza en dobles enlaces, lo que les confiere gran capacidad de control de RLs.

4.4.1. PAPEL DE LA DIETA EN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE

La dieta tiene un papel fundamental en el mantenimiento de un buen estado de salud a lo largo de todas las etapas de la vida, pues el ser humano obtiene de los alimentos sustancias cuyas propiedades pueden influir en la salud de manera beneficiosa o, por el contrario, causar un perjuicio. Cada vez hay más evidencia de su relación directa con enfermedades crónicas, el envejecimiento celular y el daño oxidativo, siendo de esta manera un elemento fundamental en la prevención (11,12).

Más concretamente, de los alimentos de la dieta se adquieren moléculas antioxidantes y otros elementos que son necesarios mantener para la correcta actividad de los sistemas antioxidantes, así como para la reparación del daño oxidativo, es decir, para el mantenimiento del equilibrio REDOX (13). Por medio de los alimentos vegetales como frutas, verduras, frutos secos y bebidas derivadas de vegetales (como la cerveza y el vino), entre otros, somos capaces de adquirir antioxidantes constituyendo así una importante fuente exógena que aumenta la respuesta del organismo frente al estrés oxidativo (14).

Por tanto, cada vez hay más evidencia científica que recomienda una dieta variada y rica que incluya alimentos con capacidad antioxidante que participen en la prevención de enfermedades relacionadas con el daño oxidativo y el envejecimiento celular (15,16)

4.5. ESTRÉS OXIDATIVO

Como hemos comentado anteriormente, los RLs son moléculas inestables y muy reactivas. Tratando de buscar el equilibrio intercambian electrones con otras moléculas de su entorno reduciéndose y oxidándose entre ellas, dando lugar a una reacción en cadena que puede conducir a la aparición de estrés oxidativo, una situación de desequilibrio entre agentes

oxidantes y antioxidantes a favor de los primeros. En condiciones normales, hay una formación continua de prooxidantes compensada por la formación de antioxidantes (1).

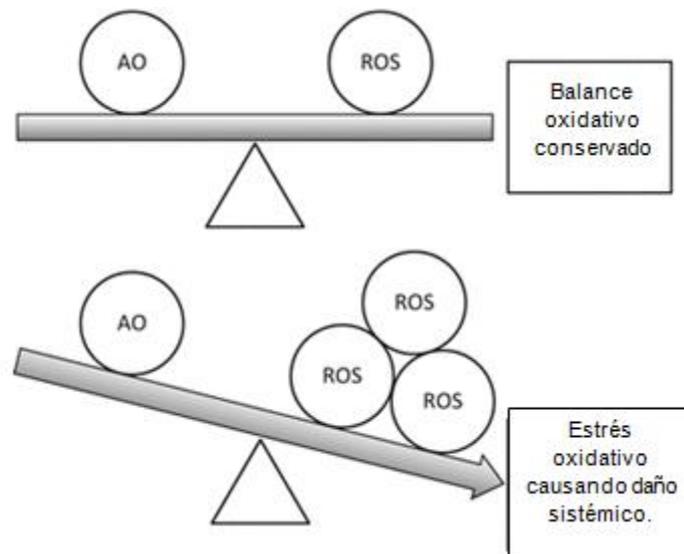


Figura 9. *Modificación del equilibrio entre los antioxidantes y las especies reactivas del oxígeno.*

4.5.1. ESTRÉS OXIDATIVO DURANTE LA GESTACIÓN Y LA LACTANCIA

El estrés oxidativo ya aparece en las primeras semanas de embarazo tanto en la madre como en el feto en procesos fisiológicos como la regulación de la angiogénesis de la placenta y en patologías como la preeclampsia. El momento del parto supone el paso de un ambiente intrauterino con una presión de oxígeno baja a un ambiente extrauterino aerobio con una presión de oxígeno mucho mayor, lo que supone una exposición del recién nacido (RN) a una elevada concentración de RLs (17). Por otra parte, el crecimiento y maduración de órganos y sistemas propios de la etapa neonatal suponen requerimientos oxidativos elevados que no suceden en otras etapas de la vida.

Sin embargo, en estas etapas y especialmente al nacimiento el neonato carece de un sistema antioxidante maduro que sea capaz de hacer frente al estrés oxidativo propio de esta fase. Durante la gestación, la protección del estado oxidativo la realiza la madre aportando antioxidantes al feto a través de la sangre del cordón en la etapa intrauterina. Tras el nacimiento, gracias al amamantamiento la madre contribuye de manera considerable al mantenimiento del estado oxidativo de su hijo con el aporte de un sistema antioxidante a través de su leche que consigue suplir los déficits antioxidantes del neonato y le ayuda a combatir el estrés oxidativo

propio de esta época y a reparar los daños producidos (18). Esto le supone a la madre necesidades dietéticas extra que debe suplir con sus propias reservas o con aportes exógenos.

4.5.2. ALIMENTACIÓN DURANTE LA LACTANCIA

Como hemos visto en el apartado anterior, embarazo, parto y nacimiento suponen retos oxidativos muy significativos tanto para la madre como para su descendencia.

La infancia es un periodo de alto riesgo nutricional y un daño oxidativo continuado puede tener consecuencias a largo plazo. Hoy en día existe evidencia de que la dieta y el aporte de antioxidantes de la misma influyen en el estado de salud ya desde el periodo intrauterino y los primeros años de la infancia.

La dieta materna es, pues, determinante no solo para su propia salud, sino para la de su descendencia, tanto en el correcto desarrollo y crecimiento adecuados del feto durante el embarazo como en el aporte adecuado de antioxidantes que evite el estrés oxidativo a ambos (13). Una adecuada dieta pre-gestación, durante el embarazo y durante el periodo puerperal y la lactancia permiten a la mujer hacer frente adecuadamente a las necesidades antioxidantes tanto propias como en su progenie. Sabiendo que un desequilibrio en el equilibrio REDOX y el estrés oxidativo resultante de este puede dañar tanto a la madre como al bebé (19), se recomienda incluir en la dieta de la mujer embarazada y lactante alimentos ricos en antioxidantes.

Mediante la lactancia, se consigue el mantenimiento de un estado oxidativo adecuado gracias al paso de un complejo sistema antioxidante a través de la leche materna. Esta, en condiciones normales, le aporta todos los nutrientes necesarios para su normal desarrollo, así como todo tipo de antioxidantes que son imprescindibles mientras que no hay otro aporte exógeno y hasta que el propio sistema alcanza un nivel de madurez apropiado. No obstante, en ocasiones la madre parte de una situación de reservas bajas y el aporte nutritivo de la dieta durante la lactancia no es adecuado; esto puede generar carencias nutricionales que se agudizan en etapas de mayor exigencia como es la lactancia (19). Existen estudios que indican que un estado oxidativo insuficiente en la madre es muy probable que pueda ser transmitido a su progenie (20). Por ello, es fundamental evitar en la madre una ingesta deficiente o una carencia previa de antioxidantes por la influencia que ello pudiera tener en el lactante.

4.6. LECHE MATERNA

Actualmente existe un creciente interés hacia la lactancia materna en los países desarrollados debido a la evidencia de los numerosos beneficios que proporciona a corto, medio y largo plazo (20). En este sentido, la Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses y continuar hasta los 2 años o hasta que la madre y el niño lo deseen (21).

4.6.1. COMPOSICIÓN

Se distinguen tres tipos de leche basados en la diferente composición láctea:

El calostro producido durante los primeros días postparto, de la que destacamos su elevado contenido en factores antiinfecciosos y antioxidantes como los betacarotenos, inmunoglobulinas A, lactoferrina, linfocitos y macrófagos. La leche de transición es producida entre el 4º y el 15 día y su composición varía a lo largo de los días aumentando gradualmente el contenido en agua, lactosa y grasas y disminuyendo el de proteínas. Finalmente, se habla de leche madura a partir de los 15 días después del parto, aunque su composición continúa variando durante la lactancia. Sus principales componentes son agua, lactosa, galactosacáridos, proteínas y compuestos nitrogenados, grasa, minerales y vitaminas.

En este trabajo se aborda la composición de la leche humana principalmente desde el punto de vista de su contenido y funciones antioxidantes

- **Hidratos de carbono (HC):** el principal es la lactosa, necesaria para la absorción de calcio, hierro y magnesio y como aporte energético. Ciertos oligosacáridos participan en la defensa antiinfecciosa y antiinflamatoria, pues promueven la colonización intestinal por flora bacteriana bifidógena que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas, parásitos y hongos.
- **Fracción nitrogenada:** dentro de la fracción proteica, un grupo representativo son las inmunoglobulinas, siendo la IgA la más abundante y estando presente en mayor cantidad en el calostro (22). La caseína es destacable debido a su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, probablemente a través de un incremento de la auto-oxidación del hierro. Asimismo, los péptidos resultantes de la digestión de la caseína poseen una notable capacidad para secuestrar el anión superóxido (23). La lactoferrina es también un potente antioxidante que limita la producción de RLs. La lisozima brinda protección contra la oxidación aguda y crónica por medio de modificaciones genéticas que determinan la respuesta al estrés oxidativo, lo que da como resultado mayores niveles de reservas antioxidantes y resistencia frente a los RLs y ROS. También abundan los aminoácidos libres

como la cisteína, que actúa como precursor del glutatión. Se han hallado niveles significativos de enzimas antioxidantes, como la catalasa, la superóxido dismutasa o la glutatión oxidasa. La leche materna contiene también polifenoles y flavonas e isoflavonas y algunas prostaglandinas como la PGE1 y PGE2 tienen importantes propiedades antioxidantes. Otros componentes presentes con menor importancia antioxidante son las poliaminas, las tioredoxinas, diversos factores del crecimiento (24).

- **Lípidos:** es el componente con mayor variabilidad interpersonal. La proporción de ácidos grasos varía en función de la dieta materna, de los depósitos maternos y en menor medida de neosíntesis en la glándula mamaria.
- **Vitaminas:** el aporte exógeno a través de la leche materna de vitamina A y carotenoides es imprescindible y los niveles están directamente relacionados con la ingesta dietética materna. Los niveles de vitamina E en el RN son muy bajos al nacimiento y menores todavía en los RN pretérmino que son más susceptibles al daño oxidativo al sufrir de una baja relación de vitamina E con respecto al contenido en lípidos; es por ello que el su aporte a través de la leche materna es crucial para la protección antioxidante del neonato. La vitamina E se compone de tocoferoles y tocotrienoles, de estos, el contenido en alfa-tocoferol está directamente relacionado con la capacidad antioxidante total de la leche humana madura y el resto tienen una importante actividad antioxidante, previenen la peroxidación lipídica, la oxidación de la vitamina A y de muchas enzimas, proteínas y del ADN (25). La concentración de vitamina D es baja. El contenido de vitamina K es mayor en el calostro y en la leche de transición comparado con el de la leche madura. La leche materna aporta el complejo vitamínico B y sus niveles son muy dependientes del estado nutricional de la madre, así como del aporte dietético durante la lactancia. En cuanto a la vitamina C, sus niveles dependen también de la dieta materna y el estadio de la lactancia. Se ha visto que por encima de un determinado nivel de saturación el incremento en suplementos no se traduce en un aumento de los niveles en leche. Esto sugiere la existencia de un mecanismo intrínseco de regulación que prevendría de cargas excesivas, probablemente para proteger al RN de los efectos pro-oxidantes del exceso de vitamina C (26).
- **Minerales:** su biodisponibilidad es muy alta por lo que no son necesarios niveles muy elevados. Están presentes calcio, fósforo, zinc, manganeso y selenio. De todos ellos, destacamos el selenio por su papel antioxidante, pues casi el 30% del selenio de la leche forma parte de la glutatión peroxidasa que con ella protege a sus ácidos grasos omega-3 de la oxidación (27).

4.6.2. CAPACIDAD ANTIOXIDANTE Y ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE MATERNA

La leche humana posee una elevada capacidad antioxidante y dispone de sustancias antioxidantes que no aporta ningún otro alimento en ninguna otra etapa de la vida. Gracias su composición y, especialmente, a su contenido antioxidante, la madre ayuda al recién nacido a hacer frente al estrés oxidativo. Todo ello confiere a la leche materna un importantísimo papel en la protección del neonato, superior a la de cualquier sucedáneo (28). Existe evidencia de que la capacidad antioxidante total (CAT) en la leche humana es mayor que en los sustitutos y que la concentración de MDA es menor. De hecho, se ha observado una peor situación REDOX en los neonatos alimentados con fórmulas artificiales, cuya CAT es muy inferior (29).

Dado que está destinada a ser consumida casi a la par que ser producida, está protegida de la oxidación y el deterioro de sus componentes. Se han observado niveles mayores de antioxidantes en calostro y su disminución en los días posteriores al nacimiento como una respuesta materna a las necesidades más elevadas del neonato los primeros días de vida (30). Este aporte, además, se adapta a las necesidades especiales, como demuestra el hecho de que la CAT de la leche materna es inversamente proporcional a la edad del niño amamantado y a su peso en el momento del nacimiento, actuando como mecanismo compensador de la deficiencia de antioxidantes de los neonatos, especialmente de los prematuros.

4.7. PROPIEDADES NUTRITIVAS Y ANTIOXIDANTES DE LOS ARÁNDANOS

El arándano rojo, también llamado arándano rojo americano o *cranberry*, es el fruto de la especie *Vaccinium macrocarpon* y es ampliamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica. Existen numerosas evidencias que vinculan una dieta rica en fruta y verdura con beneficios para la salud (31). Así pues, los frutos de tipo baya, incluyendo los arándanos, contribuyen a un buen estado de salud debido a su amplio espectro de sustancias bioactivas.

El uso de los arándanos se popularizó con el descubrimiento del papel del zumo de arándano en la prevención de las infecciones del tracto urinario (32). Más allá de esa función antibacteriana y antiséptica, se sabe que tienen propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas, antioxidantes y actividad protectora frente a enfermedades degenerativas y de riesgo cardiovascular. En este estudio nos centraremos en sus propiedades antioxidantes.

Como ya hemos comentado, los arándanos presentan una amplia variedad de sustancias bioactivas, entre ellas, vitamina C, vitamina A, β -caroteno y, característicamente, un elevado contenido en compuestos fenólicos (33). Estos últimos son los que le confieren sus propiedades

antioxidantes. Los polifenoles actúan de manera directa neutralizando las especies reactivas del oxígeno, o bien de manera indirecta al modular la expresión de genes que, a su vez, regulan la expresión de enzimas antioxidantes como la catalasa y el glutatión, induciendo así un aumento en la respuesta antioxidante endógena. Entre los compuestos fenólicos presentes en el arándano predominan los flavonoides y, característicamente, las antocianinas; se trata de pigmentos que le aportan el color característico al fruto y se ha visto que su contenido aumenta con la maduración y depende del cultivo y el tamaño del fruto (34). Pertenecientes también al grupo de los flavonoides encontramos flavonoles, destacando la quercetina y la mircetina. Otro flavonoide mayoritario en el arándano son los flavan-3-ol. Por último, compuestos polifenólicos formados por oligómeros y polímeros de flavanoles unidos mediante un enlace simple entre C4 y C8 o entre C4 y C6, los denominados PACs (35).

Así pues, a parte de la protección endógena frente al estrés oxidativo, el aporte de antioxidante a través de la dieta es un factor protector adicional en el mantenimiento del equilibrio REDOX. Teniendo en cuenta la importancia de la capacidad antioxidante de la leche materna que debe hacer frente a la carga oxidativa aumentada propia del periodo perinatal, se plantea explorar la posibilidad de mejorar la capacidad y el contenido antioxidante de la leche humana mediante la adición de arándanos a la dieta materna habitual pues, al tratarse este fruto de una de las mayores fuentes de antioxidantes naturales, parece un candidato adecuado. A pesar de la evidencia de sus beneficios, no existe consenso acerca de la dosis o forma adecuada de suplementación.

5. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Con estos antecedentes, la hipótesis que se plantea es la siguiente:

La suplementación de la dieta materna con arándanos mejora la capacidad antioxidante de la leche materna en madres sanas.

Para comprobar la hipótesis anterior, se plantearon los siguientes objetivos:

Objetivo general:

Valorar si la suplementación de la dieta materna con arándanos desecados influye en el estado oxidativo de la leche materna de madres sanas.

Objetivos específicos:

1. Estudiar la evolución del estado oxidativo de la leche materna a lo largo del tiempo de seguimiento.
2. Comprobar si un suplemento nutricional como los arándanos es capaz de mejorar el balance oxidativo en la leche de madres sanas.
 - 2.1. Analizar la influencia de la adición de arándanos sobre la capacidad antioxidante total de la leche materna.
 - 2.2. Analizar la influencia de la adición de arándanos sobre la defensa antioxidante de la leche materna.
 - 2.3. Comprobar la adición de arándanos es capaz de mejorar el daño oxidativo a biomoléculas en la leche materna.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. REACTIVOS

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

6.2. SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA

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

Tabla 2. Valor nutricional de los arándanos marca "Hacendado" de Mercadona.

VALOR NUTRICIONAL	POR 100 G DE PRODUCTO
Grasas (de las cuales)	0,5 g
Saturadas	0,1 g
Monoinsaturadas	0,2 g
Poliinsaturadas	0,2 g
Hidratos de carbono (de los cuales)	83,2 g
Azúcares	68,9 g
Fibra alimentaria	5,7 g
Proteínas	0,7 g
Sal	0,0 g

6.3. EQUIPOS

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

- **Cromatógrafo líquido de alta resolución Waters compuesto por:**
 - Bomba cromatográfica: Agilent Technology 1100 series binary HPLC Pump.
 - Degasificador Agilent Technology de fases móvil serie 1100
 - Detector de fluorescencia FLD Agilent Technology 1200 con celda de 8 μ L.
 - Detector de Diodos (DAD) Diode Array Detection Agilent Technology 1100 series
 - Inyector: Agilent Technology 1050 con loop de 100 μ l.
 - Ordenador IBM Window 2000 Pro.
 - Software: HP ChemStation
- **Espectrofotómetro:** Kontron Instruments modelo Uvikon 922
- **Centrífugas:**
 - Centrífuga refrigerada Sorvall, modelo SS-34
 - Centrífuga refrigerada Heraeus, Megafuge 1.0
 - Centrífuga refrigerada Eppendorf, modelo 5415 R
 - Centrífuga refrigerada Heraeus, modelo Sepatech 200
 - Centrífuga de mesa Heraeus Sepatech, modelo Labofuge Ae
 - Hettich zentrifugen Universal 320 R Balanzas:
 - Balanza de precisión Mettler, modelo AM-100
 - Balanza Ohaus, modelo Navigator TM
- **Otros equipos:**
 - pHmetro Crison, modelo microph 2001. Hamilton Liq-Glass
 - Homogeneizador: Junke and Kunkel, IKA-Werk, modelo RW 20 DZM
 - Sistemas de tratamientos de agua: Milli Q gradiente A10 de Millipore
 - Baños termostáticos de temperatura regulable de Selecta modelo Tectron 3471300 y Barnstead/Lab-Line modelo Max Q 7000
 - Agitadores magnéticos Minishaker IKA, modelo MS2, Heidolph modelo MR 3001 K y SBS modelo A-163, Lab-Line Instruments Inc. USA
 - Lector de placas: Bio-Rad, modelo BENCHMAK, Microplate reader
 - Ultracongeladores, congeladores y neveras

6.4. TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio programado, observacional y experimental, cuyo diseño experimental se describe con detalle en los apartados siguientes.

6.5. POBLACIÓN DE ESTUDIO

Mujeres sanas, con recién nacidos sanos, que acuden a la consulta del pediatra para seguimiento postnatal y ayuda con la lactancia materna entre enero del 2017 y diciembre del 2017.

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

A. Criterios de inclusión:

- Madres sanas de un hijo sano a término con peso adecuado para la edad gestacional, y mayor de 21 días, que alimentan a su hijo/hija con lactancia materna exclusiva, no fumadoras, no consumidoras de tóxicos, con estado nutricional normal y sin restricciones dietéticas específicas.
- Que entendieran y hablaran español y aceptaran las condiciones del estudio: Acudir a dos visitas concertadas con la pediatra y aceptar una posible suplementación de la dieta con arándanos.

B. Criterios de exclusión:

- Alguna patología asociada
- Necesidad de ingesta de medicación durante el seguimiento
- Necesidades dietéticas especiales
- Abandono de la lactancia materna exclusiva

6.6. TAMAÑO MUESTRAL

Este trabajo de fin de grado se engloba en el marco de un proyecto más amplio en el que se contempló un tamaño muestral mayor correspondiente a un total de 60 madres. No obstante, el tamaño final de la muestra en este estudio se redujo ya que lo adaptamos a las condiciones de un solo TFG, quedando finalmente una muestra de 22 madres.

6.7. REQUERIMIENTOS ÉTICOS Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

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

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

6.8. SEGUIMIENTO Y RECOGIDA DE MUESTRAS

En el proyecto principal al cual pertenece este trabajo se realizó un seguimiento más amplio incluyendo una recopilación mayor de datos y un número mayor de variables a analizar donde las participantes debieron recoger 3 registros dietéticos de 24 horas a partir de la primera visita. A la hora de llevar a cabo este trabajo solo se van a tener en cuenta las extracciones de leche materna y, concretamente, los parámetros relacionados con el estrés oxidativo de la misma.

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

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

La asignación a un grupo suplementado con arándanos o sin suplemento, se realizó por método aleatorio, siguiendo un sistema alterno, de tal manera que a la primera madre se le dieron arándanos y a la siguiente no, excepto en el caso de que alguna no quisiera, de modo que se les asignaba a las dos siguientes. Los arándanos fueron proporcionados por parte del equipo investigador.

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

La primera visita comenzó con la fase de captación en la que se informó a cada madre sobre los objetivos del estudio, sus características y las exigencias esperadas. Tras esto, firmaron el consentimiento informado tras haber sido informadas previamente de manera verbal sobre los posibles inconvenientes a causa de la participación. Se pesó y midió a cada madre y, en caso de ser asignada al grupo control + arándanos se le entregaron 2 bolsas de arándanos deshidratados. A continuación, se entregaron los formularios en instrucciones para recoger “3 registros

dietéticos de 24 horas” (Anexo 4) y se procedió a la recogida de la 1ª muestra de leche. La recogida de la muestra se realizó bajo condiciones estándar de extracción de la leche, utilizando un sacaleche eléctrico Medela, proporcionado por la casa Medela. Se les citó para la siguiente visita a los 21 días. Finalmente, en esta segunda visita las madres entregaron los registros dietéticos cumplimentados, se repasó la información recogida en ellos y se realizó la recogida de la 2ª muestra de leche materna, dando por finalizado el seguimiento.

Tras las extracciones todas las muestras se congelaron de forma inmediata hasta su recogida por parte de la doctoranda que las transportó en hielo seco hasta el laboratorio de la Universitat Jaume I, donde se mantuvieron congeladas a -80°C hasta su procesamiento para realizar las pertinentes determinaciones bioquímicas.

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

6.9. PARÁMETROS FISIOLÓGICOS A ANALIZAR

Los parámetros analizados en este estudio fueron:

1. Capacidad Antioxidante total en leche materna
 - Método ABTS
2. Antioxidantes en leche materna
 - Polifenoles totales
 - GSH
3. Daño oxidativo a biomoléculas
 - Contenido en grupos carbonilo, indicador del daño a proteínas

6.9.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL

Para la determinación de la capacidad antioxidante total se siguió el método $\text{ABTS}^{\bullet+}$ de Miller y Rice Evans (36) modificado por Pellegrini (37), basado en la oxidación del ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6 sal diamónica del ácido sulfónico) por el persulfato potásico para formar el radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$, el cual es reducido en presencia de antioxidantes donadores de hidrógeno. El $\text{ABTS}^{\bullet+}$ tiene un color verde azulado que absorbe luz a 734 nm y pierde el color al pasar de nuevo a su forma reducida tras la acción de las sustancias antioxidantes presentes en el líquido estudiado, en este caso la leche materna. Este radical reacciona con casi todos los antioxidantes, hidrofóbos o hidrófilos y no se ve afectado por fuerzas iónicas.

La generación del reactivo ABTS•+, se realizó mezclando ABTS 7mM con la solución de persulfato potásico 2.45 mM en una proporción 1:1 v/v.

Para realizar la determinación se añadieron 20 µL de muestra y 980 µL de reactivo de ABTS•+. Se realizó un blanco de muestra con 20 µL de muestra + 980 µL de agua miliQ. Posteriormente, se determinó la actividad antioxidante total espectrofotométricamente a 734 nm. Los resultados fueron expresados como TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity). La recta de calibrado con Trolox se realizó a partir de una solución estándar de Trolox.

6.9.2. DETERMINACIÓN LA DEFENSA ANTIOXIDANTE

6.9.2.1. CONTENIDO EN POLIFENOLES

El contenido total de polifenoles se midió mediante el método Folin-Ciocalteu. El método se basa en la oxidación de los polifenoles con el reactivo de Folin (mezcla de fosfomolibdenato y fosfotungstenato). Al mezclar la muestra de leche con el reactivo, se consigue la formación de un complejo azul cuya absorbancia se midió espectrofotométricamente a 750 nm.

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

6.9.2.2. CONTENIDO EN GSH

Para poder cuantificar el GSH de las muestras, se usó el método de Reed et al. (38) basado en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles, seguido de una derivatización cromófora con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobenzénico), dando lugar a derivados N-DPN. Estos derivados son rápidamente separados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH.

Fases móviles y disoluciones de trabajo:

La fase móvil A se prepara mezclando metanol (MeOH) y H₂O MilliQ en proporción 4:1. Para preparar la fase móvil B se pesan 65,62 g de acetato de sodio anhidro (NaAc), los diluimos en 210 mL de H₂O MilliQ y añadimos 150 mL de ácido acético (HAc) y 640 mL de MeOH.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético (IAA) 100 mM y m-cresol 2 mM. Se pesan 0,0112 mg de m-cresol purple y se disuelven en 10 mL de H₂O MilliQ. Así, conseguimos una disolución de 2 mM. Posteriormente se pesan 0,1859 g de IAA, se añade 1 mL de la disolución de m-cresol 2mM y se enrasan con un volumen final de 10 mL con H₂O MilliQ.

La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4-dinitrobenzeno) 1,5% p/v etanol (EtOH) puro. En nuestro caso, se trataba de DNFB sólido, por lo que pesamos 0,1125 g y los disolvimos en 100 mL de EtOH.

Estas disoluciones deben prepararse cada día y conservarse en la nevera hasta su utilización protegidas de la luz solar mediante papel de aluminio.

Para preparar el tampón KHCO₃/K₂CO₃ se pesan 2,315 g de KHCO₃ y 1,151 g de KOH y se disuelven en 10 mL de H₂O.

Patrón madre:

Los patrones son muestras de concentración conocida que nos permiten establecer relaciones entre la señal que nos da el equipo y la concentración. Para preparar las soluciones madre partimos de GSSG 10 mM, GSH mM y Glutámico 10 mM (todos en 10 mL de H₂O MilliQ), a partir de los cuales prepararemos un patrón mix de 10 mM.

Curva patrón:

La derivarización de los patrones es la misma que la de las muestras.

Para preparar las curvas patrones, pasamos de un patrón mix de 10 mM a un patrón de 1 mM (dilución 1/10). A partir de este preparamos:

- Patrón mix 100 µM, diluyendo 100 µL en 900 µL de H₂O MilliQ.
- Patrón mix 80 µM, diluyendo 80 µL en 920 µL de H₂O MilliQ.
- Patrón mix 60 µM, diluyendo 60 µL en 940 µL de H₂O MilliQ.

- Patrón mix 40 μM , diluyendo 40 μL en 960 μL de H_2O MilliQ.
- Patrón mix 20 μM , diluyendo 20 μL en 980 μL de H_2O MilliQ.
- Patrón mix 0 μM .

Después, de cada uno de estos tomamos 180 μL y les añadimos 20 μL de ácido perclórico (PCA) 20%.

Para las muestras de leche, las concentraciones de patrones se ajustan a 0, 10, 20, 30 y 40 μM .

Procedimiento:

Se homogenizan las muestras y se les añade PCA, según el protocolo.

El procedimiento parte de 200 μL de muestra sobre los que se añaden 40 μL de solución 1 y se agita en vórtex. Posteriormente cada mezcla se ajusta a un pH 9 por adición de 60 μL tampón $\text{KHCO}_3/\text{K}_2\text{CO}_3$. Agitamos despacio hasta que adoptó una coloración morada. Incubamos durante 30 minutos en hielo y en oscuridad para, posteriormente añadir 200 μL de solución 2 y agitar en vórtex. Volvemos a añadir 20 μL de KOH/KHCO_3 para ajustar el pH y agitamos hasta que la muestra cambie a un color amarillo-verdoso. Incubamos las muestras en oscuridad a 4 $^\circ\text{C}$ en nevera durante 4h ya que es el tiempo que se requiere para que se formen los derivados N-DNP. Una vez transcurrido el tiempo, centrifugamos a 13.000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC.

Procedimiento en HPLC:

Fase móvil	Tampón NaAc/HAc 3,45M / H_2O-MeOH (20:80)
Columna	Kromsil-NH ₂ , 250 x 4,6 mm 5 μm .
Bomba	Gradiente
Temperatura	25 $^\circ\text{C}$
Flujo	1 mL/min
Inyección	50 ó 1000 μL
Detector	DAD (365 nm)
Tiempo	45 min (Ac. Glut. 10,7 min; GSH 31,4 min; GSSG 37,2 min)

El área del pico obtenida es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra, que se calcula por interpolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

6.9.3. DETERMINACIÓN DEL DAÑO OXIDATIVO

6.9.3.1. CONTENIDO EN GRUPOS CARBONILO (GC)

La oxidación proteica se mide mediante la cuantificación de los grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos, según el procedimiento de Levine *et al.* (39) con algunas modificaciones de Tian *et al.* (40).

La DNFH unida a proteínas se cuantifica colorimétricamente tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

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

6.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el Software IBM SPSS Statitics versión 24 (IBM Corporation).

Realizamos en primer lugar un análisis descriptivo de cada variable estudiada y estudiamos la normalidad de sus distribuciones con la prueba de Shapiro-Wilks dado que nuestro tamaño muestral es menor de 40 sujetos.

La medida de tendencia central utilizada ha sido la media aritmética. La medida de dispersión de los datos utilizada fue el error estándar.

Los resultados presentados fueron analizados con la prueba ANOVA para medidas repetidas de un factor. Se establecieron los valores con significación estadística aquellos con una $p < 0,05$.

A las variables categóricas que definen los grupos que deseamos comparar se les denomina independientes o factores, mientras que a la variable cuantitativa en la que deseamos comparar los grupos se la denomina dependiente. En nuestro caso, la variable independiente es el grupo al que pertenece cada madre, en el que distinguimos grupo control (C) y grupo suplementado con arándanos (C+A). Como variables dependientes, las medidas de los valores de los parámetros fisiológicos estudiados al inicio y al final del estudio. A la hora de realizar el análisis, se definió el tiempo como variable intra-sujetos, y el grupo como variable inter-sujetos.

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

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

7. RESULTADOS

7.1. DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE TOTAL DE LA LECHE

Se observa un aumento de la CAT en ambos grupos tras los 21 días de duración del estudio. Puesto que el nivel crítico (valor $p = 0,031$) asociado al factor *tiempo* es menor que 0,05, podemos concluir que las diferencias en la CAT de la leche en los dos momentos temporales son estadísticamente significativas.

En segundo lugar, puesto que el nivel crítico (valor $p = 0,548$) asociado al efecto de la interacción *tiempo-grupo* es mayor que 0,05, afirmamos que no existe efecto significativo de la interacción. Es decir, a lo largo del tiempo no hay diferencias significativas en los polifenoles totales entre los dos grupos.

Tabla 3. CAT medida con el método ABTS en la leche de los dos grupos de madres al inicio al final del estudio. Los resultados están expuestos en media \pm error estándar.

CAT ($\mu\text{g/mL}$)	Día 1	Día 21
C	467,3 \pm 12,04	488,4 \pm 11,01
C+A	502,6 \pm 15,5	538,8 \pm 15,2

Tabla 4. Significancia de los valores de CAT a lo largo del tiempo y de su efecto con la interacción del grupo.

	Valor p
Tiempo	0,031
Tiempo*Grupo	0,0548

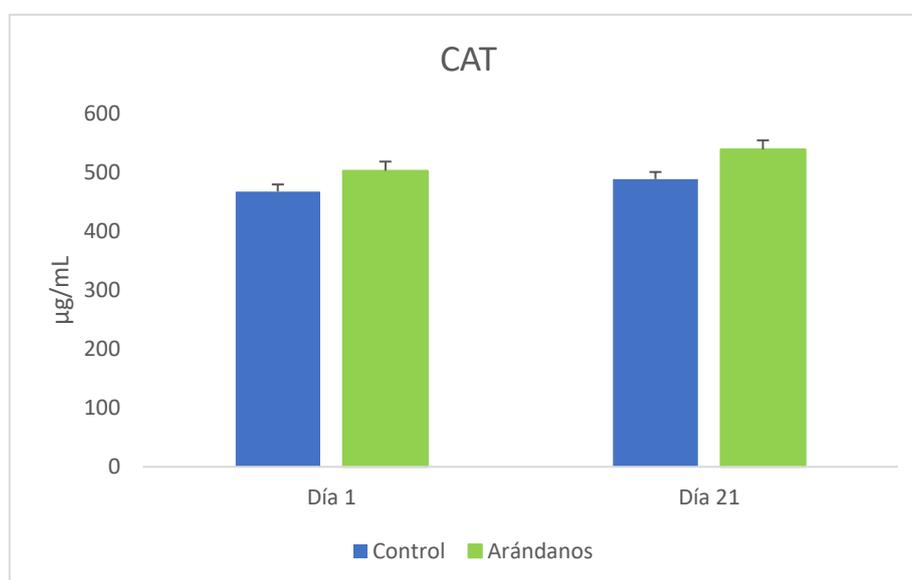


Figura 3. Concentración de CAT en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.

7.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ANTIOXIDANTES

7.2.1. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE POLIFENOLES TOTALES

Se observa un aumento de los polifenoles totales en ambos grupos tras los 21 días de duración del estudio, siendo este incremento mayor en el grupo suplementado con arándanos. No obstante, puesto que el nivel crítico (valor $p = 0,095$) asociado al factor *tiempo* es mayor que 0,05, las diferencias asociadas al factor tiempo no son estadísticamente significativas.

En segundo lugar, puesto que el nivel crítico (valor $p = 0,117$) asociado al efecto de la interacción *tiempo-grupo* es mayor que 0,05, afirmamos que no existe efecto significativo de la interacción. Es decir, a lo largo del tiempo no hay diferencias significativas en los polifenoles totales entre los dos grupos.

Tabla 5. Concentración de polifenoles totales medida en los dos grupos de madres al inicio al final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expuestos en media \pm error estándar.

PT ($\mu\text{g/mL}$)	Día 1	Día 21
C	238,2 \pm 3,8	238,8 \pm 5,04
C+A	238,4 \pm 3,7	256,5 \pm 7,4

Tabla 6. Significancia de los valores de polifenoles totales a lo largo del tiempo y de su efecto con la interacción del grupo.

	Valor p
Tiempo	0,095
Tiempo*Grupo	0,117

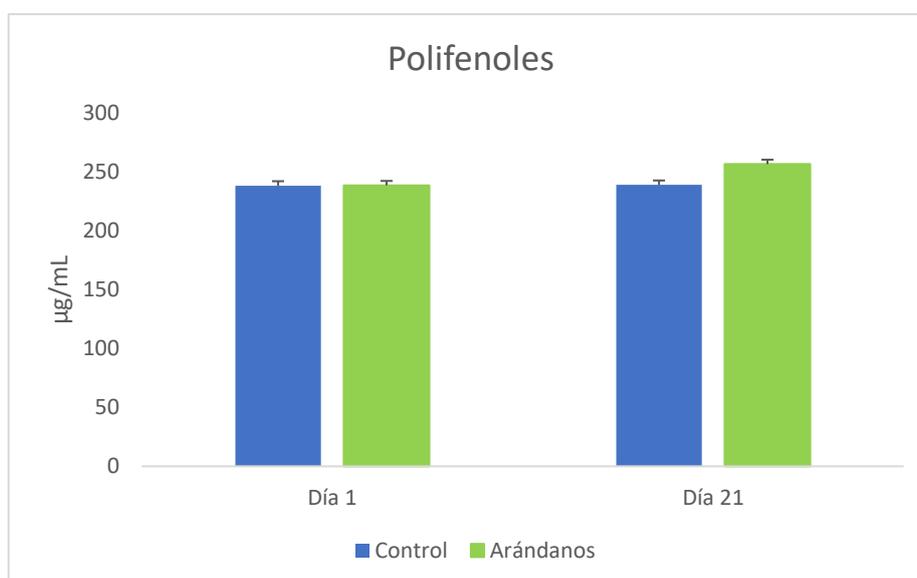


Figura 4. Concentración de polifenoles totales en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.

7.2.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GLUTATIÓN (GSH)

Se observa un aumento del contenido de GSH a lo largo del tiempo en ambos grupos. No obstante, puesto que el nivel crítico (valor $p = 0,218$) asociado al factor *tiempo* es mayor que

0,05, las diferencias en el contenido de GSH en los dos momentos temporales no son estadísticamente significativas

En segundo lugar, puesto que el nivel crítico (valor $p = 0,271$) asociado al efecto de la interacción *tiempo-grupo* es mayor que 0,05, afirmamos que no existe efecto significativo de la interacción. Es decir, a lo largo del tiempo no hay diferencias significativas en los polifenoles totales entre los dos grupos.

Tabla 5. Concentración de GSH medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expuestos en media \pm error estándar.

GSH (μmol)	Día 1	Día 21
C	2,6 \pm 0,6	3,9 \pm 0,8
C+A	3,3 \pm 0,3	3,38 \pm 0,5

Tabla 6. Significancia de los valores de GSH totales a lo largo del tiempo y de su efecto con la interacción del grupo.

	Valor p
Tiempo	0,218
Tiempo*Grupo	0,271

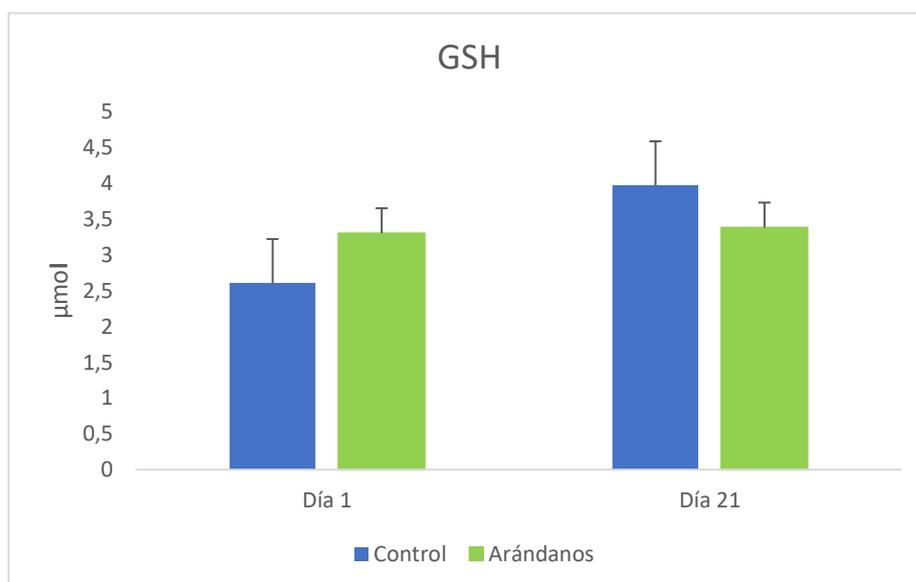


Figura 5. Concentración de GSH en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.

7.3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE GRUPOS CARBONILO EN PROTEÍNAS

Se observa un aumento del contenido de GC a lo largo del tiempo en ambos grupos, siendo este aumento mayor en el grupo control. Dado que el nivel crítico (valor $p = 0,022$) asociado al factor *tiempo* es menor que 0,05, las diferencias en el contenido de GC en los dos momentos temporales son estadísticamente significativas.

En segundo lugar, puesto que el nivel crítico (valor $p = 0,596$) asociado al efecto de la interacción *tiempo-grupo* es mayor que 0,05, afirmamos que no existe efecto significativo de la interacción. Es decir, a lo largo del tiempo no hay diferencias significativas en el contenido de GC entre los dos grupos.

Tabla 7. Contenido de grupos carbonilo en leche medido en los dos grupos de madres al inicio al final del estudio y variación a lo largo del tiempo. Los resultados están expuestos en media \pm error estándar.

CGC (nmol/mg prot)	Día 1	Día 21
C	0,9 \pm 0,08	1,2 \pm 1,1
C+A	1,004 \pm 0,09	1,1 \pm 0,07

Tabla 8. Significancia de los valores de GC totales a lo largo del tiempo y de su efecto con la interacción del grupo.

	Valor p
Tiempo	0,022
Tiempo*Grupo	0,596

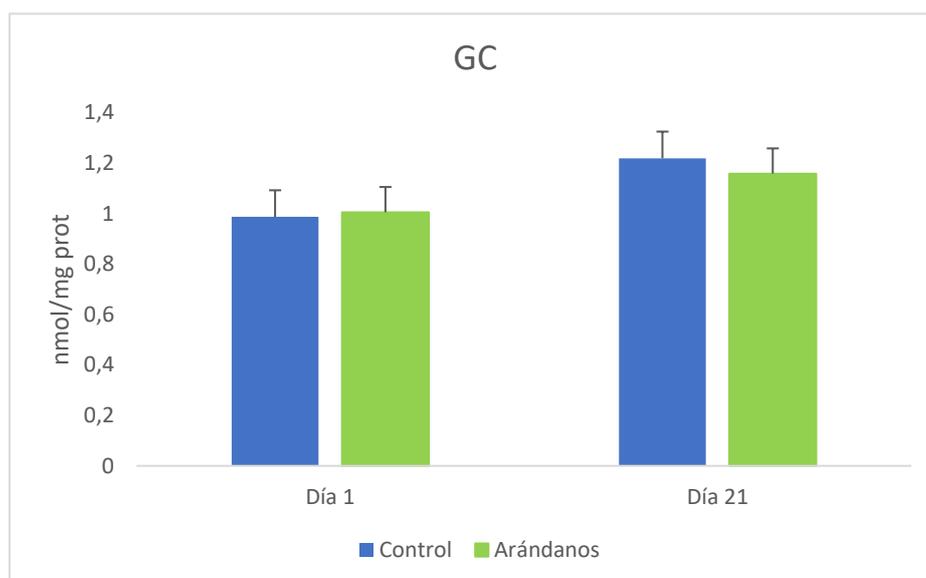


Figura 6. Concentración de GSH en la leche medida en los dos grupos de madres al inicio y al final del estudio. Los resultados están expresados en media \pm error estándar.

8. DISCUSIÓN

Para valorar el objetivo principal del presente trabajo hemos comparado el estado oxidativo (en términos de capacidad antioxidante total, contenido en antioxidantes y daño a biomoléculas) de la leche materna en madres sanas al inicio y al final del estudio una vez finalizada la suplementación dietética con arándanos.

En primer lugar, la CAT nos permite medir la capacidad de la leche materna para controlar el desequilibrio REDOX. Este parámetro, además de recoger la suma de las actividades de los antioxidantes conocidos, recoge también la de los desconocidos y de las interacciones entre todos ellos.

En cuanto a los resultados obtenidos al medir la CAT, tal y como vemos en la Figura 3, se aprecia un incremento tras los 21 días de duración del estudio en ambos grupos y el análisis estadístico nos indica que esta diferencia es estadísticamente significativa, por lo que podemos concluir que el paso del tiempo tiene un efecto significativo en la CAT de la leche materna. Nuestros resultados no encajan con los descritos en otros estudios en los que se observa una disminución de la CAT a lo largo del tiempo si no se realiza ninguna intervención (42). Conviene recordar que la leche es un líquido vivo, es muy probable que su contenido antioxidante esté dirigido a la protección antioxidante del neonato cuyas defensas son todavía inmaduras. La disminución de la CAT a lo largo del tiempo puede ser debida a un agotamiento de las reservas maternas destinadas a la reparación de su propio daño. En nuestro caso, el hecho de contar con una muestra muy pequeña puede que haya afectado a la significación de los resultados.

Al estudiar el efecto de la interacción *tiempo-grupo* el análisis estadístico nos muestra que no hay resultados estadísticamente significativos, por lo que no podemos afirmar que, a lo largo del tiempo, la suplementación con arándanos mejore la CAT de la leche de madres sanas. No existe ningún estudio en el que se evalúe la CAT de la leche de madres sanas tras la suplementación de arándanos por lo que no podemos contrastar nuestros datos con los de otras investigaciones. No obstante, en un estudio realizado en madres lactantes sanas a las que se les suplementó con cerveza sin alcohol, sí se aprecia una mejoría significativa de la capacidad antioxidante de la leche humana (41).

Abordando nuestro siguiente objetivo, para determinar el efecto de los arándanos sobre la defensa antioxidante se estudió el efecto sobre algunos de los antioxidantes más importantes de la leche.

Al analizar los resultados obtenidos sobre el contenido de polifenoles totales, tal y como se muestra en la Figura 4, el contenido en polifenoles aumenta en ambos grupos a tras los 21 días de estudio, no obstante, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las dos medidas temporales, por lo que concluimos que el paso del tiempo no tiene un efecto significativo sobre le contenido total de polifenoles en la leche.

En cuanto a la interacción del grupo, aunque se observa un aumento de polifenoles totales en ambos grupos, este aumento es mayor en el grupo suplementado con arándanos lo cual parecería indicar el efecto antioxidante de los arándanos. Sin embargo, al analizar esta variación en el tiempo con respecto al grupo, el análisis estadístico muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos, por lo que no podemos afirmar que este fruto mejore el contenido en polifenoles de la leche de las madres sanas.

Hoy en día, el interés acerca del estudio del contenido en polifenoles de los alimentos está en auge debido a su importancia en diversos procesos biológicos al tener propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, de inhibición de la agregación plaquetaria, inmunológicas e incluso de protección del ADN (43). A pesar de ello, existen pocos datos sobre su concentración en la leche humana y menos sobre su concentración en relación a la suplementación dietética materna. De hecho, a día de hoy no hay estudios en los que se determine el contenido total de polifenoles en la leche de madres sanas tras la suplementación con arándanos, por lo que no podemos comparar nuestros datos con los de otros trabajos. Existen estudios que demuestran la presencia en leche de isoflavonas tras el consumo materno de leche de soja o tofu (44). Otro estudio evaluó el contenido en polifenoles en 6 muestras de leche materna con el fin de comparar el aroma de la leche materna con el de las leches de fórmula (23). No obstante, estos autores no estudiaron el contenido total en polifenoles, ni tampoco la correlación de estos con la dieta materna. Sí se ha estudiado el contenido de polifenoles en la leche de madres sanas suplementadas con cerveza sin alcohol, y en este caso se observó que el contenido en polifenoles disminuyó con el paso del tiempo desde la fase de calostro a leche madura (41), lo cual apoyaría nuestros resultados.

Por otro lado, al analizar la variación de la concentración de GSH se observa un incremento en ambos grupos a lo largo del tiempo tal y como se aprecia en la Figura 5, curiosamente este incremento es mayor en el grupo control. A pesar de ello, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las dos medidas temporales, por lo que podemos concluir

que el paso del tiempo no tiene un efecto significativo sobre el contenido total de polifenoles en la leche.

Por otro lado, al analizar esta variación en el tiempo con respecto al grupo, el análisis estadístico muestra que no hay diferencias estadísticamente significativas entre grupos, por lo que no podemos afirmar que este fruto mejore el contenido en GSH de la leche de las madres sanas.

El hecho de que el aumento de concentración de polifenoles y GSH de nuestras muestras con el paso del tiempo no sea significativo podría ser consecuencia de la adaptación de la composición de la leche a las necesidades del recién nacido. Es posible que la tendencia natural de estos antioxidantes sea la disminución, de esta manera, puede que el contenido en antioxidantes sea mayor los primeros días para hacer frente a las necesidades del neonato en los primeros días de vida la ser este periodo el de máximo estrés oxidativo y de máxima vulnerabilidad. Además, es posible que los arándanos sí puedan tener efecto sobre otros antioxidantes que no hemos medido en este trabajo.

Para determinar el efecto sobre el daño a biomoléculas se estudió el efecto sobre el contenido en grupos carbonilo, pues este parámetro está ampliamente reconocido como un buen marcador de daño oxidativo a proteínas (6). Tras el análisis, podemos observar que su contenido aumenta en ambos grupos tras los 21 días de duración del estudio, habiendo un mayor aumento de GC en el grupo control, tal y como se observa en la Figura 6, lo que parecería confirmar el efecto antioxidante de los arándanos. A pesar de ello, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre las dos medidas temporales, por lo que concluimos que el paso del tiempo no tiene un efecto significativo sobre el contenido en grupos carbonilo.

En cuanto a la interacción con respecto al grupo, tras el análisis estadístico no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de madres, por lo que no podemos afirmar que el grupo suplementado con arándanos presente menor daño a proteínas que el grupo control. No existe ningún estudio que evalúe el efecto de los arándanos en madres sanas sobre los grupos carbonilo. Sí existen estudios sobre el efecto de la suplementación de la dieta de madres lactantes con antioxidantes, observándose una disminución en el GC de la leche (41). Dado que este trabajo se encuentra enmarcado en un estudio más amplio en el que se determinaron otros marcadores de daño a biomoléculas, es posible que en otros parámetros sí que pudiéramos encontrar resultados significativos compatibles con los descritos en la evidencia

previa; por ejemplo, se ha descrito que la suplementación con arándanos ha sido capaz de compensar el daño a lípidos.

Una vez analizadas todas las variables, el hecho de no haber obtenido ningún resultado estadísticamente significativo es posible que se deba a varias limitaciones. En primer lugar, a una cuestión de tamaño muestral dado que el trabajo principal en el que se enmarca este TFG contaba con una n mayor, lo que posiblemente ha afectado a la significación de los resultados. Es posible que un estudio sobre un mayor número de madres y un seguimiento durante un periodo más largo pudiera detectar mayores diferencias. Por otro lado, este TFG se enmarca dentro un proyecto mayor, por lo que se han seleccionado únicamente algunas variables del proyecto principal y en otros parámetros que no hemos medido sí se han obtenido resultados significativos. Otra posible limitación podría ser el formato de la suplementación, se trata de arándanos desecados y procesados que acumulan mayor cantidad de grasas y azúcares en comparación con los arándanos frescos, lo cual podría influir en su contenido antioxidante; de cara a futuras investigaciones sería interesante poder realizar un estudio con frutos frescos sin ningún tipo de procesado.

Así pues, a pesar de no haber obtenido resultados estadísticamente significativos, es posible que en futuras líneas de investigación con una muestra mayor, un mayor número de variables y administrándose arándanos frescos puedan obtenerse resultados significativos y de cara a la práctica clínica, podría incluirse este fruto en las recomendaciones nutricionales de las mujeres gestantes y lactantes sanas. Asimismo, podría plantearse como tratamiento coadyuvante en patologías propias de la lactancia que supongan un mayor estrés oxidativo como la mastitis.

9. CONCLUSIONES

Una vez analizados los resultados de este trabajo podemos concluir que:

1. El paso del tiempo tiene un efecto significativo sobre la CAT de la leche.
2. Este estudio no permite observar una mejoría significativo de los arándanos sobre la capacidad antioxidante total.
3. En relación contenido de antioxidantes, los arándanos no inducen un aumento significativo de polifenoles ni de concentración de GSH, por lo que no podemos afirmar que mejoren la defensa antioxidante de la leche.

4. En relación al daño a biomoléculas, la suplementación con arándanos no induce una disminución significativa de los grupos carbonilo.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Vol. 39, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon; 2007. p. 44–84. doi: 10.1016/j.biocel.2006.07.001
2. Betteridge DJ. What is oxidative stress? In: *Metabolism: Clinical and Experimental*. W.B. Saunders; 2000. p. 3–8. doi: 10.1016/S0026-0495(00)80077-3
3. Harwell B. Biochemistry of oxidative stress. In: *Biochemical Society Transactions*. Portland Press; 2007. p. 1147–50. doi: 10.1042/BST0351147
4. Justo C, Venereo Gutiérrez R. DAÑO OXIDATIVO, RADICALES LIBRES Y ANTIOXIDANTES. Vol. 31, *Rev Cubana Med Milit*. 2002.
5. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. 2014. doi.org/10.1155/2014/360438
6. Hawkins CL, Davies MJ. Detection, identification, and quantification of oxidative protein modifications. 2019. doi: 10.1074/jbc.REV119.006217
7. Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. 2010. doi: 10.1093/glycob/cwq171
8. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *BiochemSoc*. 2007. 1147–1150. doi: 10.1042/BST0351147
9. Forman HJ, Zhang H, Rinna A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. Vol. 30, *Molecular Aspects of Medicine*. NIH Public Access; 2009. p. 1–12. doi: 10.1016/j.mam.2008.08.006
10. Olivares D, Cabrera B, Martínez S, Teresa M. Redalyc Sistema de Información Científica [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=67415744003>
11. Sánchez-Valle V, Méndez-Sánchez N. Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad ARTÍCULO DE REVISIÓN. Vol. 20, *Rev Invest Med Sur Mex*, Julio-Septiembre. 2013.
12. Martínez Alvarez JR, Bellés VV, López-Jaén AB, Marín AV, Codoñer-Franch P. Effects of alcohol-free beer on lipid profile and parameters of oxidative stress and inflammation in elderly women. *Nutrition*. 2009 Feb 1;25(2):182–7. doi: 10.1016/j.nut.2008.08.005
13. Al-Gubory KH, Fowler PA, Garrel C. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. Vol. 42, *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. Pergamon; 2010. p. 1634–50. doi: 10.1016/j.biocel.2010.06.001

14. Biodisponibilidad de los flavonoides de la ... - Cerveza y Salud [Internet]. [cited 2021 May 26]. Available from: <https://www.yumpu.com/es/document/read/4112107/biodisponibilidad-de-los-flavonoides-de-la-cerveza-y-salud>
15. Grosso G. Antioxidants: From Dietary Consumption to Therapeutic Implementation. *Current Pharmaceutical Design*. 2019 Sep 27;25(22):2405–6. doi: 10.2174/138161282522190913101559
16. Zeisel SH. Is maternal diet supplementation beneficial? Optimal development of infant depends on mother's diet 1-4. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition; 2009. p. 685S. doi: 10.3945/ajcn.2008.26811F
17. Mutinati M, Pantaleo M, Roncetti M, Piccinno M, Rizzo A, Sciorsci RL. Oxidative stress in neonatology: A review. Vol. 49, *Reproduction in Domestic Animals*. John Wiley & Sons, Ltd; 2014. p. 7–16. doi: 10.1111/rda.12230
18. Erdem M, Harma M, Harma IM, Arikan I, Barut A. Comparative study of oxidative stress in maternal blood with that of cord blood and maternal milk. *Archives of Gynecology and Obstetrics*. 2012 Feb; 285(2):371–5. doi: 10.1007/s00404-011-1993-8
19. Allen LH. Multiple micronutrients in pregnancy and lactation: An overview. In: *American Journal of Clinical Nutrition*. American Society for Nutrition; 2005. doi: 10.1093/ajcn/81.5.1206
20. Schack-Nielsen L, Larnkjær A, Michaelsen KF. Long term effects of breastfeeding on the infant and mother. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer, Dordrecht; 2005. p. 16–23. doi: 10.1007/1-4020-3535-7_3
21. DEPARTMENT OF NUTRITION FOR HEALTH AND DEVELOPMENT DEPARTMENT OF CHILD AND ADOLESCENT HEALTH AND DEVELOPMENT WORLD HEALTH ORGANIZATION THE OPTIMAL DURATION OF EXCLUSIVE BREASTFEEDING A SYSTEMATIC REVIEW [Internet]. [cited 2021 May 27]. Available from: <http://www.who.int/child-adolescent-health>
22. Lawrence RM, Pane CA. Human Breast Milk: Current Concepts of Immunology and Infectious Diseases. *Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care*. 2007 Jan;37(1):7–36. doi: 10.1016/j.cppeds.2006.10.002
23. Li W, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition*. 2009 Jan;25(1):105–14. doi: 10.1016/j.nut.2008.07.017
24. Lönnerdal B. Bioactive Proteins in Human Milk: Mechanisms of Action. *Journal of Pediatrics*. 2010 Feb;156(2 SUPPL.). doi: 10.1016/j.jpeds.2009.11.017
25. Romeu Nadal M. Estudio de la conservación de la leche humana y de los preparados para lactantes. 2006 [cited 2021 May 27]; Available from: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=3785&info=resumen&idioma=SPA>
26. Hoppu U, Rinne M, Salo-Väänänen P, Lampi AM, Piironen V, Isolauri E. Vitamin C in breast milk may reduce the risk of atopy in the infant. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2005 Jan;59(1):123–8. doi: 10.1038/sj.ejcn.1602048

27. Hannan MA, Faraji B, Tanguma J, Longoria N, Rodriguez RC. Maternal milk concentration of zinc, iron, selenium, and iodine and its relationship to dietary intakes. *Biological Trace Element Research*. 2009 Jan;127(1):6–15. doi: 10.1007/s12011-008-8221-9
28. L'Abbe MR, Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 2000;31(3):270–4. doi: 10.1097/00005176-200009000-00013
29. Jareño Roglán EJ. Efecto de la conservación de la leche humana sobre su actividad antioxidante. *Acta Pediátrica Española*. 2014;72(7):239–43.
30. Ochoa JJ, Ramirez-Tortosa MC, Quiles JL, Palomino N, Robles R, Mataix J, et al. Oxidative stress in erythrocytes from premature and full-term infants during their first 72h of life. *Free Radical Research*. 2003 Mar 1;37(3):317–22. doi: 10.1080/1071576021000050438
31. Wallace TC, Bailey RL, Blumberg JB, Burton-Freeman B, Chen C y. O, Crowe-White KM, et al. Fruits, vegetables, and health: A comprehensive narrative, umbrella review of the science and recommendations for enhanced public policy to improve intake. Vol. 60, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. Taylor and Francis Inc.; 2020. p. 2174–211. doi: 10.1080/10408398.2019.1632258
32. Avorn J, Monane M, Gurwitz JH, Glynn RJ, Choodnovskiy I, Lipsitz LA. Reduction of Bacteriuria and Pyuria After Ingestion of Cranberry Juice. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 1994 Mar 9;271(10):751–4. doi: 10.1001/jama.1994.03510340041031
33. Joseph S v., Edirisinghe I, Burton-Freeman BM. Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2016 Feb 17;56(3):419–44. doi: 10.1080/10408398.2013.767221
34. Brown PN, Murch SJ, Shipley P. Phytochemical diversity of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Aiton) cultivars by anthocyanin determination and metabolomic profiling with chemometric analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2012 Jan 11;60(1):261–71. doi: 10.1021/jf2033335
35. Skrovankova S, Sumczynski D, Mlcek J, Jurikova T, Sochor J. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. Vol. 16, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2015. p. 24673–706. doi: 10.3390/ijms161024673
36. Miller NJ, Rice-Evans CA. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS+ radical cation assay. *Free Radical Research*. 1997;26(3):195–9. doi: 10.3109/10715769709097799
37. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*. 1999 May;26(9–10):1231–7. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00315-3
38. Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide,

and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry*. 1980;106(1):55–62. doi: 10.1016/0003-2697(80)90118-9

39. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, et al. Determination of Carbonyl Content in Oxidatively Modified Proteins. *Methods in Enzymology*. 1990 Jan 1;186(C):464–78. doi: 10.1016/0076-6879(90)86141-h
40. Tiana L, Caib Q, Wei H. Alterations of antioxidant enzymes and oxidative damage to macromolecules in different organs of rats during aging. *Free Radical Biology and Medicine*. 1998 Jun;24(9):1477–84. doi: 10.1016/s0891-5849(98)00025-2
41. Codoñer-Franch P, Hernández-Aguilar MT, Navarro-Ruiz A, López-Jaén AB, Borja-Herrero C, Valls-Bellés V. Diet supplementation during early lactation with non-alcoholic beer increases the antioxidant properties of breastmilk and decreases the oxidative damage in breastfeeding mothers. *Breastfeeding Medicine*. 2013 Apr 1;8(2):164–9. doi: 10.1089/bfm.2012.0059
42. Nikniaz L, Mahdavi R, Ostadrahimi A, Hejazi MA, Vatankhah AM. Effects of synbiotic supplementation on total antioxidant capacity of human breastmilk. *Breastfeeding Medicine*. 2013 Apr 1;8(2):217–22. doi: 10.1089/bfm.2012.0078
43. Babbar N, Oberoi HS, Sandhu SK. Therapeutic and Nutraceutical Potential of Bioactive Compounds Extracted from Fruit Residues. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2015 Feb 23;55(3):319–37. doi: 10.1080/10408398.2011.653734
44. Franke AA, Halm BM, Custer LJ, Tatsumura Y, Hebshi S. Isoflavones in breastfed infants after mothers consume soy. *American Journal of Clinical Nutrition*. 2006 Aug 1;84(2):406–13. doi: 10.1093/ajcn/84.1.406

11. ANEXOS

ANEXO 1. HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

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

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

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

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

Solicitamos su colaboración en este estudio y le pedimos que nos permita obtener 2 muestras de leche de unos 15ml aproximadamente (al iniciar y al finalizar el estudio). *Por tanto, usted deberá realizar dos visitas, una al iniciar el estudio y otra al finalizarlo).*

Si acepta participar en el estudio, usted será asignada a uno de los grupos anteriormente descritos, dependiendo de sus características clínicas. En el caso de ser asignada (esta selección se hará de forma aleatoria) a uno de los grupos suplementados con arándanos, solicitamos que acepte ingerir 20 g de arándanos diariamente durante 21 días. Durante las semanas de seguimiento se le *pedirá realizar 5 registros dietéticos, además de NO fumar, ingerir bebidas alcohólicas, tomar café, té o chocolate, ni estar bajo tratamientos farmacológicos ya que podrían*

interferir con el objetivo del estudio. Asimismo, la alimentación con biberones de leche artificial supondrá la exclusión del estudio. Se le proporcionará toda la ayuda necesaria para que usted pueda alimentar a su bebé con leche materna. La participación en el proyecto no conlleva ningún riesgo para su salud o la del lactante. Las muestras obtenidas durante el estudio se destinarán únicamente a los fines de investigación definidos en el mismo, y los datos que se le soliciten tendrán carácter estrictamente confidencial.

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

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

- la pediatra Dra. María Teresa Hernández Aguilar *en la Unidad de Lactancia Materna del Hospital Dr. Peset*

- la investigadora principal D^a Cristina Abad García *en el correo electrónico abadcristina@hotmail.com*

CONSENTIMIENTO INFORMADO-GENERAL

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

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

Yo,(nombre y apellidos)

he sido informada por la Dra. Maria Teresa Hernández Aguilar, colaboradora del proyecto de investigación arriba mencionado, y declaro que:

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

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

Fecha:/.../....

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

Firma de la participante:

.....

Firma de la colaboradora

María Teresa Hernández Aguilar

ANEXO 2. CEIC HOPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓN



INFORME COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓN

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

CERTIFICA

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

Servicio: C.S. Benicasim

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

Y teniendo en consideración las siguientes cuestiones:

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

EMITE UN INFORME FAVORABLE.

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

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

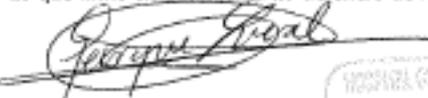
D^a Pilar Mon Carro
Diplomada en Enfermería
D. Guillermo Mena Pinilla
Facultativo Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
D. Antonio Palau Canos
Facultativo Especialista Medicina Digestiva

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

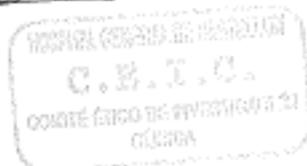
Que en dicha reunión del Comité Ético de Investigación Clínica se cumplió el quórum preceptivo legalmente.

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

Lo que firmo en Castellón a 25 de enero de 2016



Fdo. Georgina Queral Capdevila
Secretaria



ANEXO 3. CEIC HOSPITAL UNIVERSITARIO DR. PESET DE VALENCIA



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

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

CERTIFICA:

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

Valencia 3 de Mayo de 2016

Fdo.: Pilar Codoñer Franch



