

TRABAJO FINAL DE GRADO EN
MEDICINA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

ESTUDIO DEL ESTADO OXIDATIVO DE LA LECHE
HUMANA EN MADRES CON MASTITIS



Autora: Julia María García González.

Tutores: María Muriach Saurí y Pablo Baliño Remiro.

Unidad Predepartamental de Medicina. Área de fisiología.

Curso Académico 2020-2021.



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: Estudio del estado oxidativo de la leche humana en madres con mastitis.

ALUMNO/A: Julia María García González.

DNI: 26047868T

PROFESOR/A TUTOR/A: María Muriach Saurí.

MARIA EDDA | Firmado digitalmente|
MURIACH | por MARIA EDDA |
SAURI | MURIACH | SAURI
Fecha: 2021.06.02
09:28:28 +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

Lista de abreviaturas.....	1
Lista de tablas y figuras.....	3
Resumen.....	4
Abstract.....	5
Extended summary.....	6
Justificación.....	8
I. INTRODUCCIÓN.....	8
1. Metabolismo oxidativo.....	8
1.1. Radicales libres	8
1.1.1. Concepto y clases de radicales libres.....	8
1.1.2. Radicales libres más relevantes.....	9
1.1.3. Fisiopatología de los radicales libres.....	10
1.1.4. Generación de radicales libres.....	11
1.2. Estrés oxidativo.....	11
1.2.1. Concepto.....	11
1.2.2. Daño oxidativo a biomoléculas.....	12
1.3. Defensa antioxidante.....	14
2. Leche humana, composición y defensa antioxidante.....	17
2.2. Componentes de la leche materna.....	18
2.3. Capacidad antioxidante de la leche materna.....	20
3. Alimentación durante la lactancia.....	21
4. Mastitis.....	22
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....	25
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
1. Diseño experimental.....	26
1.1. Tipo de estudio.....	26
1.2. Población de estudio y ámbito.....	26
1.2.1. Criterios de inclusión.....	26
1.2.2. Criterios de exclusión.....	26

1.3. Tamaño muestral.....	27
1.4. Requerimientos éticos.....	27
1.5. Procedimiento.....	27
2. Métodos.....	27
2.1. Ensayo con muestras de leche materna.....	27
2.1.1. Recogida, transporte, conservación y procesado de las muestras.....	27
2.1.2. Estado oxidativo. Análisis laboratorio.....	28
2.1.2.1. Estudio del daño inducido a macromoléculas en la leche materna	28
2.1.2.2. Determinación de la defensa antioxidante.....	30
3. Análisis estadístico.....	32
IV. RESULTADOS.....	33
1. Estudio del daño oxidativo inducido a macromoléculas en la leche materna.....	33
2. Estudio del contenido antioxidante en la leche materna.....	34
V. DISCUSIÓN.....	35
1. Estudio del daño inducido a macromoléculas en la leche materna.....	35
2. Estudio de la capacidad antioxidante de la leche materna.....	36
VI. LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	38
VII. CONCLUSIONES.....	39
VIII. AGRADECIMIENTOS.....	40
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	41
X. ANEXO 1.....	48
XI. ANEXO 2.....	51
XII. ANEXO 3.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Alfa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
ARN	Ácido ribonucleico
β	Beta
°C	Grados centígrados
CAT	Catalasa
CGC	Contenido grupos carbonilo
cm	Centímetros
ClH	Ácido clorhídrico
δ	Delta
DNFH	2,4-dinitrofenilhidrazina
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
Fe ²⁺	Ion ferroso
Fe ³⁺	Ion férrico
GPx	Glutation Peroxidasa
GRd	Glutation Reductasa
GSH	Glutation reducido
GSSH	Glutation oxidado
H ₂ O	Agua
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HC	Hidratos de carbono
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleukina
Kcal	Kilocaloría
L	Litro
M	Molar
MDA	Malondialdehído
mg	Miligramos

min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mmol	Milimol
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
nm	Nanometros
nMol	Nanomoles
NO [•]	Óxido nítrico
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
O ₂	Oxígeno molecular
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OH [•]	Radical Hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO ⁻	Peroxinitrito
p	Significación estadística
PGE	Prostaglandinas
REDOX	Oxido-reducción
RLs	Radicales libres
RO [•]	Radical Alcoxilo
ROO [•]	Peroxilo
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
Seg	Segundos
SOD	Superóxido dismutasa
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
µg	Microgramo
µL	Microlitro
µMol	Micromoles
γ	Gamma

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

Tablas

Tabla 1. Especies reactivas más relevantes.....	9
Tabla 2. Clasificación según Thomsen.....	22

Figuras

Figura 1. Modificación del equilibrio entre los antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno.....	11
Figura 2. Esquema de los mecanismos implicados en la lipoperoxidación.....	12
Figura 3. Sistema glutatión sintetizado.....	16
Figura 4. Representación esquemática del epitelio y los conductos mamarios en condiciones fisiológicas y en situación de mastitis.....	24
Figura 5. Ejemplo de un cromatograma de la determinación de MDA.....	29
Figura 6. Efecto de la mastitis sobre la concentración de CGC.....	33
Figura 7. Efecto de la mastitis sobre la concentración de MDA.....	33
Figura 8. Efecto de la mastitis sobre la concentración de GPx.....	34
Figura 9. Efecto de la mastitis sobre la concentración de polifenoles totales.....	34

RESUMEN

La leche humana ha demostrado ser el único alimento capaz de aportar un contenido adecuado de antioxidantes durante la etapa neonatal. La exposición a radicales libres (RLs) provoca un desequilibrio entre las sustancias prooxidantes y las defensas antioxidantes, favoreciendo la presencia de daño oxidativo. Garantizar la lactancia materna y procurar que la calidad de dicha leche sea adecuada, incluye dar solución y estudiar los efectos de una de las principales causas de interrupción de lactancia, como es la mastitis.

Objetivos: Estudiar si la presencia de mastitis afecta al estado oxidativo de la leche humana.

Métodos: Para valorar el estado oxidativo de la leche se tomaron muestras en un grupo de madres sanas y en un grupo de madres con mastitis. Se analizaron dos marcadores de daño oxidativo, el malondialdehído (MDA) y el contenido de grupos carbonilo (CGC), siendo respectivamente principales productos de la peroxidación lipídica y de la oxidación a proteínas. También se analizaron dos marcadores de defensa antioxidante, la actividad glutatión peroxidasa (GPx) y los polifenoles totales.

Resultados y conclusión: Los resultados obtenidos han demostrado que la mastitis tiene un efecto sobre el estado oxidativo de la leche humana. No es un inductor de daño oxidativo, pues no se observan diferencias significativas en los valores de CGC y sorprendentemente los valores de MDA fueron mayores en el grupo control. Se observó un aumento en los componentes de defensa antioxidante medidos, tanto de la actividad GPx como de los polifenoles totales.

Palabras clave: mastitis, leche humana, malondialdehído, glutatión peroxidasa, estrés oxidativo, antioxidantes.

ABSTRACT

Human milk has proven to be the only food capable of providing adequate antioxidant content during the neonatal stage. Exposure to free radicals (RLs) causes an imbalance between pro-oxidant substances and antioxidant defences, favouring the presence of oxidative damage. Ensuring breastfeeding and ensuring that the quality of said milk is adequate, includes solving and studying the effects of one of the main causes of breastfeeding interruption, such as mastitis.

Objectives: To study if the presence of mastitis affects the oxidative state of breast milk.

Methods: To assess the oxidative state of the milk, samples were taken from a group of healthy mothers and from a group of mothers with mastitis. Two markers of oxidative damage were analysed, malondialdehyde (MDA) and the content of carbonyl groups (CGC), being the main products of lipid peroxidation and protein oxidation, respectively. Two antioxidant defence markers, glutathione peroxidase (GPx) activity and total polyphenols, were also analysed.

Results and conclusion: The results obtained have shown that mastitis has an effect on the oxidative state of human milk. It is not an inducer of oxidative damage, since no significant differences were observed in the CGC values and surprisingly the MDA values were higher in the control group. An increase was observed in the measured antioxidant defence components, both GPx activity and total polyphenols.

Key words: mastitis, human milk, malondialdehyde, glutathione peroxidase, oxidative stress, antioxidants.

EXTENDED SUMMARY

Introduction: Studies increasingly show that eating during childhood is one of the factors that will influence different physiological and metabolic processes in the short, medium and long term, thus influencing the appearance of some diseases.

Breastfeeding is the most complete food during the neonatal stage, thus covering the needs of the newborn and infant and providing species-specific nutrients suitable for the immature organism and in the process of organ and tissue formation. In this way, the antioxidant capacity of milk has been related to functions as important as the protection of the development of cognitive function and the psychomotor development of infants. This characteristic contributes to the very important protection that breastfeeding confers, superior to that of any substitute. In addition, breast milk also has a bactericidal capacity, providing defence and protection against infections in the newborn.

The world health organization (WHO) recommends exclusive breastfeeding up to 6 months of age. However, it is increasingly common for mothers to abandon breastfeeding, one of the causes of this being the appearance of problems such as mastitis. Mastitis can occur at any time during breastfeeding, being more frequent between the second and third week postpartum. The two main causes of mastitis are milk stagnation and infection. The primary cause is usually milk stagnation, which may or may not progress to infection. The incidence in Spain is estimated to be around 10%, so we can conclude that it is a common pathology among nursing mothers.

Ensuring breastfeeding and prolonging it for the appropriate time implies the need to solve those factors that may lead to its interruption, such as mastitis. In this work we intend to study how mastitis affects the oxidative state of milk by modifying the balance between pro-oxidants and antioxidants, in favour of the former. The result of this imbalance is cellular damage, and in order to alleviate the oxidative damage that occurs on the different biomolecules, the body increases its antioxidant capacity.

Objectives: the main objective of this work is to study whether the presence of mastitis modifies the oxidative state of breast milk.

Methods: to assess the oxidative state of milk, two oxidative damage markers and two antioxidant defence markers were analysed. As oxidative damage, it has been chosen to study MDA levels, this value being the most studied and reliable in lipid peroxidation, and CGC, being the main product of protein oxidation. With regard to antioxidant defence, it has been chosen to study total polyphenols and GPx activity given their involvement in the glutathione system,

the main intracellular antioxidant system. In this way, we study how oxidative stress and antioxidant defence mechanisms vary between the group of healthy mothers and the group of mothers with mastitis.

Results and conclusions: After the analysis, no statistically significant differences were observed in the CGC values between healthy mothers and mothers with mastitis, so there is no evidence that mastitis increases oxidative damage to proteins.

In MDA levels, significant differences have been observed between the different study groups, this value being higher in healthy mothers. These results could be explained due to a decrease in lipids in the milk of mothers with mastitis. With regard to antioxidant defence, both in the values of GPx activity and in those of total polyphenols, significant differences were observed between both groups, these values being higher in mothers suffering from mastitis. These results could be due to a pathophysiological compensation mechanism, consisting of a higher production of antioxidants to defend against oxidative stress induced by mastitis.

In this way, we can conclude that mastitis has an effect on the oxidative state of breast milk. It is not an inducer of oxidative damage, but it does increase antioxidant defence components.

JUSTIFICACIÓN

La leche materna es considerada el alimento más completo durante la etapa neonatal. Entre otros, la leche humana contiene cantidades nada despreciables de enzimas antioxidantes y diversos estudios muestran la superior capacidad antioxidante de la leche humana frente a la leche de fórmula. Además, se ha demostrado que los recién nacidos tienen una mejor situación REDOX y sufren menos daño oxidativo cuando son alimentados con leche materna.

Asegurar la lactancia y prolongarla durante el tiempo adecuado implica la necesidad de dar solución a aquellos factores que pueden suponer la interrupción de la misma, como lo es la mastitis. No existe apenas literatura que muestre los efectos de la mastitis sobre la composición de la leche humana. Más en concreto, no existe ningún estudio que muestre los efectos de esta patología sobre el estado oxidativo de la leche humana, haciendo especialmente relevante el trabajo planteado.

I. INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo oxidativo

El metabolismo oxidativo es la base fisiológica de procesos aerobios como la respiración celular, la fagocitosis, el transporte de moléculas a través de membrana, la acción enzimática o los procesos biogénicos. Este metabolismo se caracteriza por presentar una elevada eficiencia energética, debido al uso de oxígeno (O₂) como aceptor final de electrones, y en consecuencia de sus características pragmáticas, por generar sustancias potencialmente tóxicas y muy reactivas que inducen al daño oxidativo. Entre estas sustancias se encuentran los radicales libres y otras especies reactivas del oxígeno.

De hecho, el estudio del metabolismo oxidativo ha permitido demostrar que el envejecimiento celular y muchas otras enfermedades crónicas están relacionadas directa o indirectamente con el daño oxidativo (1-3).

1.1. Radicales libres

1.1.1. Concepto y clases de radicales libres

Los Radicales Libres (RLs) se definen como toda molécula que contiene un electrón desapareado en su orbital más externo, por lo que necesitaría de otro electrón para poseer una configuración bioquímica y electromagnética estable. Esta inestabilidad bioquímica los hace muy reactivos, y con el fin de encontrar el equilibrio, intercambian ávidamente electrones con moléculas de su entorno, desestabilizando con ello la configuración electrónica de estas últimas, que al perder

un electrón en su capa más externa pueden convertirse a su vez en nuevos RLs, originando así una reacción en cadena.

Existe un poco de controversia a la hora de designar estas especies químicas. En el organismo en condiciones de normalidad, la mayoría de los RLs proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno (como el anión superóxido y el radical hidroxilo) por este motivo muchos autores los llaman “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Ambas denominaciones (RL y ROS), no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales (como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso). No obstante, es habitual referirse a ellos indistintamente como RLs, ROS o simplemente oxidantes.

El metabolismo del óxido nítrico (NO) genera también otras especies reactivas de nitrógeno (NOS). El NO es por sí mismo un radical, debido a la existencia de un electrón desapareado en su orbital más externo. Además, en su metabolismo tienen lugar reacciones con el O₂, ROS, metales de transición o tioles, dando lugar a la producción de NOS, destacando entre ellos el peroxinitrito (ONOO⁻) por su alta reactividad. De este modo, cuando existe una producción excesiva o desmedida de NO y de las NOS que de él derivan, se produce el denominado concepto de estrés nitrosativo (4).

Tabla 1. Especies reactivas más relevantes.

Radicales	ROS	Anión superóxido	O ₂ ⁻
		Radical hidroxilo	OH
		Radical alcoxilo	RO
		Peroxilo	ROO
	NOS	Óxido Nítrico	NO

1.1.2. Radicales libres más relevantes

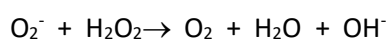
Como ya se ha comentado en el apartado anterior, la mayoría de los RLs proceden de la respiración aerobia, destacando entre ellos:

El **anión superóxido (O₂⁻)** es producido en la cadena de transporte de electrones que tiene lugar en las mitocondrias (5). Se caracteriza por su capacidad para reaccionar con otras moléculas y radicales, originando y/o propagando reacciones que dan lugar a otras especies oxigénicas reactivas mucho más tóxicas, como por ejemplo el radical hidroxilo.

El **radical hidroxilo (OH[·])** se caracteriza por presentar una vida media muy corta y por ser muy reactivo, interaccionando así con todas las biomoléculas de su alrededor (6). Se forma a partir del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) mediante la llamada reacción de Fenton:



Además, el OH[·] también se forma mediante la reacción del O₂^{·-} con H₂O₂:



El **radical peroxilo (ROO[·])** es probablemente el radical más abundante. Tiene una vida media de segundos y deriva de la reacción de O₂ con los radicales hidrocarbonados de los lípidos.

1.1.3. Fisiopatología de los Radicales Libres

No es fácil clasificar a los ROS o RLs como moléculas beneficiosas o dañinas, ya que se ha demostrado que interactúan tanto en procesos fisiológicos como patológicos.

De este modo, se ha observado que juegan un papel fundamental en el buen funcionamiento celular, actuando como segundos mensajeros e inductores genéticos interviniendo en la inactivación o activación de ciertas enzimas o, contribuyendo a la regulación de procesos inflamatorios (7,8). Esto se producirá siempre y cuando se encuentren a bajas concentraciones, ya que, en caso de acumularse pueden alterar directa o indirectamente varios mecanismo celulares y fisiológicos, pudiendo causar alteraciones de macromoléculas vitales para el ser vivo, como puede ser el ácido desoxirribonucleico (ADN) (provocando mutaciones), lípidos de membrana (provocando peroxidación) o proteínas (alterando actividades enzimáticas). Es por ello, que el organismo ha establecido mecanismos de defensa antioxidante, permitiendo así su eliminación o su transformación en moléculas estables.

Ya sea en su papel fisiológico o patológico, los investigadores han llegado al consenso de que las especies oxigenicas reactivas juegan un papel principal en los cambios de la modulación de la expresión génica y en la función celular, pudiendo así ser utilizados estos cambios como biomarcadores del estrés oxidativo.

1.1.4. Generación de radicales libres

Los RLs pueden proceder de diversas fuentes:

- **Fuentes endógenas:** Los RLs son el subproducto de procesos metabólicos como puede ser la cadena electrónica mitocondrial, la excesiva actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) fagocitaria o la activación del metabolismo del ácido araquidónico.
- **Fuentes exógenas:** Radiaciones, ozono, humo de tabaco, contaminaciones ambientales, productos químicos o incluso de la alimentación. Estos agentes pueden poseer RLs, o bien convertirse en RLs mediante el metabolismo celular y los procesos de desintoxicación.

1.2. Estrés oxidativo y daño a biomoléculas.

1.2.1. Concepto

Podemos definir el estrés oxidativo como el desequilibrio existente entre las especies prooxidantes y las antioxidantes, a favor de las primeras (9) (Fig. 1). Esta situación se produce debido a un aumento de las especies prooxidantes, a un descenso de las antioxidantes, o bien porque ambas situaciones se den simultáneamente.

El resultado de este desequilibrio es un daño celular, y con el fin de paliar el daño oxidativo que se produce sobre las diferentes biomoléculas el organismo incrementa su capacidad antioxidante.

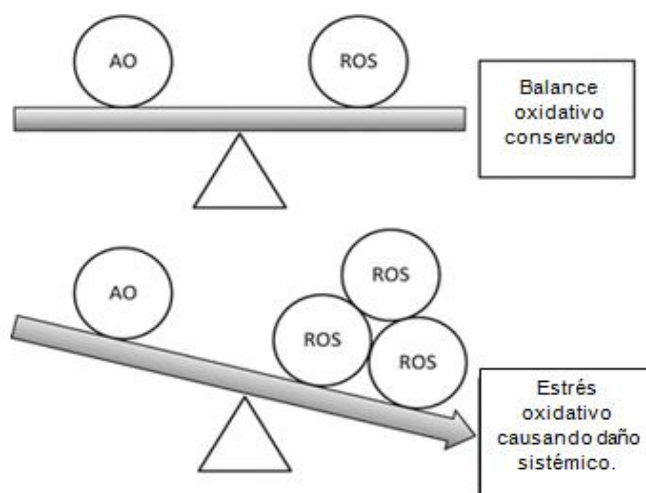


Figura 1. *Modificación del equilibrio entre los antioxidantes y las especies reactivas de oxígeno.*

AO: Antioxidantes; ROS: Especies reactivas de oxígeno.

1.2.2. Daño oxidativo a biomoléculas

Los ROS tienen la capacidad de oxidar a cualquier tipo de biomolécula, como son los lípidos, los ácidos nucleicos y las proteínas, siendo estas últimas sus principales dianas (10).

- **Daño oxidativo a lípidos**

El daño oxidativo de los lípidos se produce en un proceso conocido como peroxidación u oxidación lipídica, afectando sobre todo a las estructuras formadas por ácidos grasos poliinsaturados. Esta reacción puede ser desencadenada por diferentes ROS, pero generalmente se produce cuando el OH^\cdot es generado en la proximidad de las membranas, atacando así a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico o el decohexanoico, y originando lípidos hidroperoxidados, los cuales son muy inestables y rápidamente se descompondrán en otros productos, como aldehídos y nuevos RLs, los cuales a su vez pueden iniciar nuevas cadenas de peroxidación. Es precisamente en la propagación del daño oxidativo donde radica la importancia de los RLs (Fig. 2).

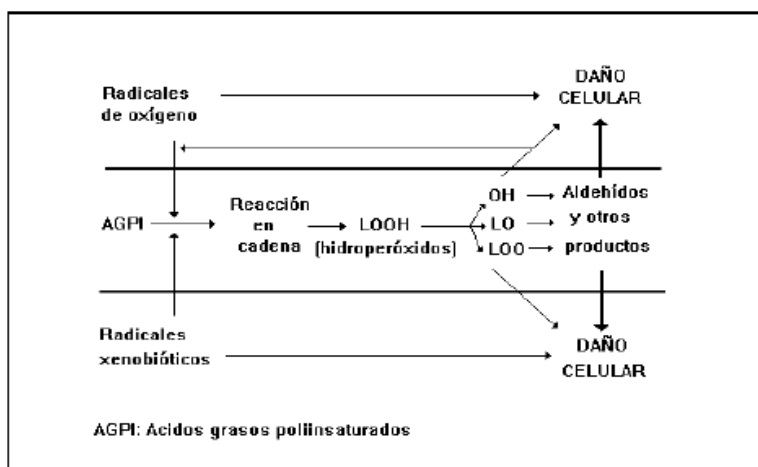


Figura 2. Esquema de los mecanismos implicados en la lipoperoxidación

Dentro de los aldehídos producidos por la oxidación de lípidos, el más ampliamente estudiado ha sido el malondialdehído (MDA) (11).

El MDA es una molécula volátil y de bajo peso molecular. Puesto que este compuesto es un producto final común de la peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido aceptada ampliamente como marcador de este proceso.

La determinación de productos remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, ha suscitado una importante atención desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han

sido implicadas en la patogénesis de algunas enfermedades. No obstante, a la hora de determinar este producto hay que tener en cuenta la técnica empleada, ya que se ha demostrado que el nivel detectado por algunas técnicas proviene no solo de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, sino también de la degradación de otros productos como azúcares, aminoácidos, aldehídos o ácidos orgánicos. (12). Es por eso, que se ha demostrado que la determinación de MDA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica.

- **Daño oxidativo a proteínas**

Los ROS son capaces de oxidar a todos los aminoácidos presentes en las proteínas, siendo especialmente sensibles a la oxidación la metionina y la cisteína. Dichas oxidaciones generan un cambio conformacional de la proteína, y en consecuencia una modificación o pérdida de su función biológica. La susceptibilidad de una proteína a ser oxidada va a depender tanto de su composición de aminoácidos como de la accesibilidad a estos por la especie oxidante (13).

El marcador utilizado para medir la oxidación de las proteínas es el contenido en grupos carbonilo (CGC), obtenidos a partir de este daño a proteínas. Estos productos son químicamente estables, lo cual es útil para su detección y para su almacenamiento. Además, los estudios de los grupos carbonilo tienen la ventaja de que no requieren equipos especiales, por lo que se puede realizar en cualquier laboratorio de bioquímica equipado.

- **Daño oxidativo a glúcidos**

Se ha observado que los monosacáridos y los disacáridos presentan cierta resistencia a la acción de los ROS, por lo que algunos se han considerado como agentes protectores celulares (14).

De esta forma, la importancia del daño oxidativo sobre los glúcidos radica en los polisacáridos con función estructural, ya que estos son despolimerizados por los RLs, alterando sus funciones celulares tales como las asociadas a la actividad de las interleuquinas (IL) y la formación de prostaglandinas (PGE), hormonas y neurotransmisores (15).

- **Daño oxidativo al ADN**

Cuando el ADN se oxida, tiene lugar fenómenos de mutaciones y carcinogénesis, hay pérdida de expresión o síntesis de una proteína, modificaciones oxidativas, deleciones e incluso los genes supresores de tumores pueden ser modificados por un simple cambio en la secuencia del ADN. Por otro lado, mencionar que el ADN mitocondrial es más susceptible al daño oxidativo que el

ADN nuclear (16). Por tanto, las lesiones en el ADN mitocondrial se acumulan con la edad en una tasa más elevada que el ADN nuclear (17).

1.3. Defensa antioxidante

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. Con el término “sustrato oxidable” se hace referencia a casi toda macromolécula que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y ADN. Sin embargo, esta definición original fue simplificada posteriormente para ajustarla al conocimiento como: *“cualquier sustancia que retrasa, previene o elimina el daño oxidativo sufrido por una molécula diana”* (6).

Los antioxidantes por tanto actúan impidiendo que otras moléculas se unan al O₂, al reaccionar más rápido con los RLs y los ROS que el resto de las moléculas presentes. La acción del antioxidante se lleva a cabo mediante su propia oxidación con el fin de reducir moléculas vitales o más importantes.

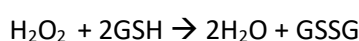
De esta forma, el organismo utiliza la defensa antioxidante en la medida necesaria para reparar los daños que se producen y tratar de controlar la producción desordenada de RLs, con el objetivo de mantener así un equilibrio u homeostasis REDOX. En ocasiones, este equilibrio no es perfecto y continuamente ocurre algún grado de daño oxidativo. Esto es así porque según algunos autores, es energéticamente más eficiente reparar los daños que evitar al máximo la oxidación (18), pero posiblemente también porque en algunas ocasiones se producen RLs cuya producción y diseminación es prácticamente imposible de interceptar (19).

A día de hoy, a pesar de que la investigación sobre el equilibrio REDOX (como mantenerlo y como prevenir su alteración) ha logrado muchas respuestas, sigue existiendo muchas incógnitas, las cuales precisan ser estudiadas y despejadas, como el aporte idóneo de antioxidantes o las posibilidades terapéuticas ante situaciones de estrés oxidativo (20, 21).

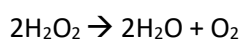
En cuanto a su clasificación, desde el punto de vista fisiológico los antioxidantes pueden ser clasificados en primarios (previenen la formación de nuevos RLs), secundarios (actúan cuando existe un aumento en la producción de RLs y los sistemas enzimáticos están desbordados) y terciarios (encargados de la reparación de las biomoléculas ya dañadas). Por otra parte, se pueden clasificar desde el punto de vista bioquímico:

- Antioxidantes enzimáticos:

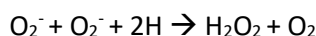
- ❖ **Glutación peroxidasa (GPx):** Es una enzima que contiene selenio, y es capaz de reducir el H_2O_2 y los hidroperóxidos orgánicos hasta agua y alcohol, utilizando como donador de electrones al glutatión reducido (GSH). Es la forma común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. Tiene como función proteger a las membranas celulares del estrés oxidativo. La mayor parte es encontrada en el citosol, pero también en la matriz mitocondrial. Por ejemplo, el hígado, que es un lugar importante de detoxificación y el cual está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una elevada actividad de GPx.



- ❖ **Catalasa (CAT):** Está ampliamente distribuido por el organismo humano, teniendo elevada concentración en hígado y riñón, baja concentración en tejido conectivo y epitelios y prácticamente nula en tejido nervioso. Se localiza a nivel celular, sobre todo en peroxisomas. Presenta dos funciones principales: catalítica y peroxidativa y forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de elevadas concentraciones de H_2O_2 .



- ❖ **Superóxido dismutasa (SOD):** Cataliza la reacción de dismutación del O_2^- a H_2O_2 , que podrá ser reducido, de nuevo, por la CAT o por la GPx.



- Antioxidantes no enzimáticos (hidrofílicos) o “scavengers”:

- ❖ **Glutación (GSH):** Se trata de un tripéptido compuesto de ácido glutámico, cisteína y glicina. Su síntesis tiene lugar en el hígado y es transportado hasta los tejidos mediante la sangre. Está considerada la molécula antioxidante endógena más importante. El conjunto formado por el glutatión y las enzimas relacionados con su metabolismo se conoce como sistema glutatión (22). Podemos encontrarlo reducido (GSH), en la mayoría de los casos, u oxidado (GSSH).

Cuando se produce daño oxidativo, el GSH se oxida a GSSH mediante una reacción catalizada por la GPx. El GSSH formado se reduce inmediatamente a GSH por acción de la glutatión reductasa (GRd) (dependiente de NADPH) (Fig. 3).

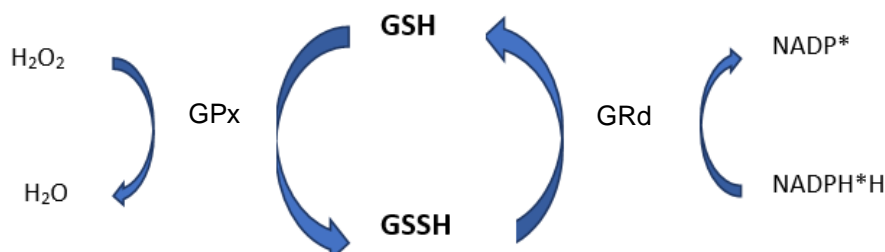


Figura 3. Sistema glutatión sintetizado.

De esta manera, el glutatión es un factor esencial para la GPx, por lo que su disminución puede deteriorar la acción de la enzima, con la consiguiente parada de los mecanismos limitadores de la peroxidación lipídica (23).

- ❖ **Vitamina E:** Se trata de una vitamina liposoluble esencial que incluye ocho esteroisómeros, de los cuales el α -tocoferol es el más conocido. Se localiza sobre todo en las membranas celulares y en las lipoproteínas plasmáticas. Se considera el antioxidante natural más potente, capaz de bloquear la cadena de lipoperoxidación en la membrana celular, simulando así tener un papel protector en el daño por RLs asociados a cáncer, enfermedad cardiovascular y en el envejecimiento. La principal fuente de vitamina E son los aceites vegetales (girasol, maíz, soja) y productos elaborados a partir de estos aceites (margarinas, mayonesas, repostería).
- ❖ **Vitamina C:** Se trata de una vitamina hidrosoluble. En el ser humano, al igual que en otras especies animales, debe ser ingerida en la dieta. La vitamina C es uno de los antioxidantes más potentes en fase acuosa, que actúa a nivel extracelular y citosólico. Presenta características estructurales que le permite reaccionar con algunas especies oxigénicas y reactivas. Además, es capaz de regenerar la vitamina E y aumentar los niveles de glutatión. Las principales fuentes son la fruta, especialmente los cítricos, el kiwi, las fresas, el melón y los arándanos.
- ❖ **Polifenoles:** Estos compuestos se agrupan según su estructura química en dos grandes grupos, los no flavonoides y los flavonoides. La estructura química de los flavonoides es precisamente la que les confiere capacidad para actuar como

captadores de RLs. De hecho, existe un consenso de que la actividad antioxidante de los flavonoides resulta de sus propiedades secuestradoras de RLs, impidiendo así la formación del OH^\cdot (24). Se encuentran presentes en alimentos de origen vegetal, especialmente en las frutas y en las verduras.

- ❖ **Carotenoides:** Se pueden clasificar según su polaridad en xantofilas (algo polares) y en los carotenos (muy poco polares). Los carotenoides presentan una importante actividad antioxidante, debida a un extendido sistema de dobles enlaces conjugados. Sin embargo, esta actividad depende en gran medida de la concentración de O_2 existente, actuando como antioxidante en presencia de radicales peroxilos con concentraciones bajas de O_2 , y como prooxidante con concentraciones altas de O_2 .

2. Leche humana, composición y propiedades antioxidantes

Los estudios cada vez evidencian más que la alimentación durante la infancia es uno de los factores que va a influir sobre diferentes procesos fisiológicos y metabólicos a corto, medio y largo plazo, influyendo así sobre la aparición de algunas enfermedades.

De este modo, la leche materna es el alimento más completo durante la etapa neonatal, cubriendo así las necesidades del recién nacido y lactante y aportando nutrientes específicos de especie idóneos para el organismo inmaduro y en pleno proceso de formación de órganos y tejidos.

Basándonos en la diferencia de composición láctea que ocurre durante las primeras semanas de lactancia, se puede hablar de tres tipos de leche:

- **Calostro:** Se produce durante los primeros días después del parto, es un fluido espeso y de color amarillento debido a la alta concentración de betacarotenos. Su valor calórico medio es de 67 kcal/100 mL y contiene mayor cantidad de proteínas (inmunoglobulinas), vitamina A, E, K, ácido siálico, colesterol y algunos minerales (sodio, hierro, zinc, azufre y potasio) que la leche madura (25). Es fundamental para el recién nacido, ya que le aporta un elevado contenido en factores defensivos (antiinfecciosos y antioxidantes), flora bifidógena para colonizar el intestino neonatal y prebióticos, que, junto con los factores de defensa, evitan la adherencia de microorganismos patógenos en tubo digestivo neonatal. De esta forma, y junto con el aporte de enzimas, ayuda al funcionamiento y maduración del sistema digestivo del lactante, facilitando la

eliminación del meconio y disminuyendo los riesgos de hiperbilirrubinemia en el recién nacido (26).

- **Leche de transición:** Se produce entre el 4º y 15º día postparto y cuyo volumen aumenta progresivamente hasta alcanzar alrededor de los 600-700mL/día entre el 8º y 15º día. Su composición va variando a lo largo de los días, de ahí que reciba el nombre de leche de transición; en este proceso de transformación a leche madura va aumentando progresivamente el contenido en agua, lactosa y grasas y disminuyendo proporcionalmente el de proteínas (incluyendo el de inmunoglobulinas).
- **Leche madura:** Se produce alrededor de los 15 días postparto. La composición de dicha leche sigue evolucionando a lo largo de la lactancia, siendo los principales componentes de la leche madura: agua, lactosa, galactosacáridos, proteínas y compuestos nitrogenados, grasas, minerales y vitaminas (25, 27). Además, también contiene elementos traza, enzimas, aminoácidos, hormonas, células vivas, ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y flora bacteriana. Asegura el aporte suficiente al lactante durante los primeros 6 meses de vida (28).

2.1. Componentes de la leche humana

Actualmente, aún queda mucho que investigar hasta caracterizar completamente todo el contenido y funciones antioxidantes presentes en la leche humana.

- **Hidratos de carbono (HC)**

El principal HC presente en la leche es la lactosa. Es necesaria para la absorción de calcio, hierro, magnesio, así como de otros elementos y como aporte energético (29). A nivel intestinal, se produce el desdoblamiento de la lactosa, obteniéndose así galactosa, imprescindible para la formación entre otros de los galactolípidos, indispensables para el desarrollo del sistema nervioso central del lactante y de la defensa antiinfecciosa. Además de lactosa, contiene glucosa, galactosa, L-fucosa y ácido siálico. Por otra parte, cada vez cobra mayor interés su capacidad antiinflamatoria, la cual puede contribuir en la baja incidencia de enfermedades inflamatorias en el neonato amamantado (30).

- **Fracción nitrogenada**

Algunas de las más representativas son:

1. Inmunoglobulinas (Ig): La más abundante es la IgA (constituye el 90% de todas las inmunoglobulinas de la leche materna) y está presente en mayor cantidad en el calostro.

Tanto IgA como IgM tienen una función defensiva, ya que la producción propia en el lactante no alcanza niveles maduros antes de los 2 años (26).

2. **Caseína:** Constituye el 30-40% de las proteínas de la leche humana. Durante los primeros días está prácticamente ausente, comenzando a sintetizarse a partir del 3-4 días, y aumentando sus concentraciones a medida que la leche evoluciona a leche madura. La leche humana contiene solo dos fracciones de caseína: la beta y la kappa, la beta es la más abundante, y contribuye a la biodisponibilidad del calcio. Su papel antioxidante consiste en la capacidad que tiene de inhibir la peroxidación lipídica, posiblemente a través de un aumento de la auto-oxidación del hierro. Además, los péptidos resultantes de la digestión de la caseína tienen una elevada capacidad para secuestrar el O_2^- (31).
3. **Lactoferrina:** Las madres con recién nacidos a término presentan mayor concentración de lactoferrina en el calostro (54%) que en leche madura (28%) (32); relación que se invierte si el parto es prematuro. En cuanto a su papel antioxidante, se trata de una proteína capaz de limitar la producción de RLs. Además, presenta una acción bacteriostática y antiinflamatoria a nivel gastrointestinal.

- **Lípidos**

Los lípidos juegan un importante papel en la protección antiinfecciosa y antiinflamatoria del neonato. Los principales lípidos de la leche materna son los triglicéridos, fosfolípidos, ácidos grasos y esteroides. El aporte de ácidos grasos esenciales de la leche humana proviene de los lípidos circulantes en el suero materno, que, a su vez, proviene de la dieta, de los depósitos maternos y de la neosíntesis en la glándula mamaria. Es por esto, que la proporción de ácidos grasos varía según la dieta materna (33).

- **Vitaminas**

El contenido en vitaminas de la leche materna está destinado a cubrir las necesidades nutricionales del recién nacido, y varía, con el estado nutricional y el aporte dietético de la madre durante la lactancia.

1. **Vitamina A y carotenoides:** Sus necesidades son especialmente elevadas en los recién nacidos, por lo que su aporte exógeno a través de la leche materna es imprescindible. La leche materna contiene vitamina A en forma de esteres de retinol y de carotenoides, tanto precursores de vitamina A, como de carotenoides que carecen de actividad pro-vitamina A pero que poseen una importante cualidad como antioxidante. Los

carotenoides presentes en la leche son fundamentalmente α -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina, luteína y licopeno.

2. **Vitamina E:** Es crítica para la protección antioxidante del neonato, especialmente del recién nacido pretérmino o enfermo (34). El α -tocoferol es el compuesto más abundante, representando el 76,5% del total. Además, contiene γ -tocoferol y δ -tocoferol. La capacidad antioxidante de la leche materna humana madura está directamente relacionada con el contenido de α -tocoferol, pero los demás compuestos también contribuyen a la actividad antioxidante previniendo la peroxidación lipídica, la oxidación de la vitamina A y del ADN.
3. **Complejo vitamínico B:** La leche materna lo aporta en forma de cobalamina (B12), piridoxina (B6), tiamina (B1), ácido fólico (B9), niacina (B3) y ácido pantoténico (B5).
4. **Vitamina C:** Sus niveles dependen del estadio de lactancia (siendo mayor en el calostro) y de la ingesta materna. La vitamina C ayuda al mantenimiento de la barrera natural frente a la infección, estimula las actividades fagocíticas y antibacterianas de los leucocitos, aumenta la producción de Ig y estimula la secreción de interferón (35).

- **Minerales**

En cuanto a los minerales presentes en la leche materna podemos destacar:

1. **Calcio/fósforo:** Su relación en la leche humana es de 2:1 y en esta forma son ambos fácilmente absorbidos por el lactante.
2. **Hierro:** Tiene una biodisponibilidad del 50%, debido a la presencia de lactoferrina, la acidez del tracto gastrointestinal y la presencia de zinc y cobre.
3. **Selenio:** Sus niveles séricos son más elevados en los recién nacidos amamantados que en los alimentados con fórmula. Casi el 30% del selenio de la leche forma parte de la GPx, protegiendo así a los ácidos grasos omega-3 de la oxidación. Las cantidades de este mineral en la leche materna depende tanto de la ingesta materna como del estadio de la lactancia, encontrándose en mayor cantidad en la leche madura (36).

2.2. Capacidad antioxidante de la leche materna

Una vez producido el parto, el recién nacido pasa a un ambiente extrauterino aerobio, cuya presión de oxígeno es casi cinco veces superior a la del ambiente intrauterino, por lo que el neonato se enfrenta a una elevada concentración de RLs, la cual debe ser controlada por el sistema de defensa antioxidante del neonato, cuyo desarrollo sucede de forma paralela al

desarrollo dado durante la gestación. La leche humana es el único alimento capaz de aportar un adecuado contenido antioxidante, con el fin de ayudar a proteger el estado oxidativo del neonato. De este modo, la capacidad antioxidante de la leche materna se ha relacionado con funciones tan importantes como la protección del desarrollo de la función cognitiva y el desarrollo psicomotor de los lactantes.

Una vez que el recién nacido ingiere los antioxidantes de la leche materna, estos actúan a nivel local, protegiendo el tracto respiratorio e intestinal (protección de las células epiteliales) y a nivel general (reducción espontánea del citocromo C) (37, 38).

Además, se ha observado que la leche materna es capaz de adaptarse a las necesidades del recién nacido. De esta forma, los niveles de antioxidantes presentes en la leche son mayores en el calostro, ya que las necesidades requeridas por el recién nacido son mayores durante los primeros días de vida (39).

La leche humana aporta antioxidantes que en otras épocas de la vida dependen de la producción propia, como enzimas, coenzimas, prostaglandinas o factores inhibidores de enzimas prooxidantes. Esta característica contribuye a la importantísima protección que el amamantamiento confiere, superior a la de cualquier sustituto. Cabe mencionar, que la leche también posee una capacidad bactericida, proporcionando defensa y protección contra las infecciones del recién nacido (40).

3. Alimentación materna durante la lactancia

La composición de la dieta materna es determinante no solo para un desarrollo y crecimiento adecuado del feto durante el embarazo, sino también para asegurar un aporte adecuado de antioxidantes que evite el estrés oxidativo a ambos.

A pesar de la importancia de la alimentación durante el embarazo y la lactancia, son muchas las mujeres que toman dietas poco sanas por defecto (pobres en frutas, verduras, hortalizas o legumbres) o por exceso (demasiadas calorías, grasas, sal y exceso de grasas saturadas) poniendo así en riesgo su estatus nutricional, y generando déficits nutricionales que se acentuarán durante las etapas de mayor exigencia nutricional, como puede ser la lactancia.

De esta forma, la mayoría de la literatura coincide en que la lactancia es una etapa de mayor demanda nutricional (41). Sin embargo, este es un tema poco investigado, especialmente en el campo de los lactantes a término.

4. Mastitis

La organización mundial de la salud (OMS) recomienda la lactancia materna exclusiva hasta los 6 meses de vida. No obstante, cada vez es más frecuente que las madres abandonen la lactancia, siendo una de las causas de esto la aparición de problemas como la mastitis.

La mastitis puede producirse en cualquier momento de la lactancia. Sin embargo, es más frecuente que se produzca entre la segunda y la tercera semana postparto. La incidencia de esta enfermedad, según varios estudios, oscila entre el 3 y el 33% de las madres lactantes (42,43). En España, aunque se carece de datos epidemiológicos, se estima que tiene una incidencia en torno al 10% (44). Es por esto, que podemos concluir que es una patología común entre las madres lactantes.

Las dos principales causas de la mastitis son el estancamiento de la leche y la infección. Basándonos en la observación clínica, podemos concluir que habitualmente la causa primaria de mastitis es el estancamiento de la leche, pudiendo esta progresar o no hacia la infección (45).

Thomsen y cols. aportaron en 1984 pruebas adicionales de la importancia del estancamiento de la leche. Realizaron un recuento de leucocitos y bacterias en la leche de las mamas con clínica de mastitis y propusieron la siguiente clasificación:

Tabla 2. Clasificación según Thomsen

	Leucos $<10^6$ /mL leche	Leucos $>10^6$ /mL leche
Bacterias $<10^3$ /mL leche	ESTANCAMIENTO DE LECHE	MASTITIS NO INFECCIOSA
Bacterias $>10^3$ / mL leche		MASTITIS INFECCIOSA

a) Estancamiento de leche (leucos $<10^6$ /mL leche y bacterias $<10^3$ /mL leche)

Se produce como consecuencia de una ingurgitación precoz de los pechos tras el parto o por la extracción ineficaz del bebé de la leche producida. Los signos clínicos son una masa dolorosa en el pecho, a menudo con enrojecimiento de la piel en dicha zona y habitualmente las mujeres se encuentran apiréticas y con buen estado general (46). La extracción eficaz mediante el amamantamiento continuado puede prevenir en gran parte esta afección.

b) Mastitis no infecciosa (leucos $>10^6$ /mL leche y bacterias $<10^3$ /mL leche)

El estancamiento de la leche en la mama puede originar una respuesta inflamatoria. La leche contiene citoquinas, tanto inflamatorias como antiinflamatorias. Se cree que las citoquinas

antiinflamatorias protegen al niño, mientras que las inflamatorias, como la IL-8 pueden ser para proteger el pecho de la infección. Durante la mastitis se ha detectado un aumento de los niveles de IL-8 en el pecho, lo cual es un signo de que está ocurriendo una respuesta inflamatoria. Esta inflamación es la responsable de los signos y síntomas de la mastitis: parte del pecho está doloroso, enrojecido, hinchado y endurecido; en este caso a menudo la mujer presenta fiebre y mal estado general (47).

c) Mastitis infecciosa (leucos $<10^6$ /mL leche y bacterias $>10^3$ /mL leche)

Se produce cuando no se resuelve el estancamiento de la leche y se vence la protección proporcionada por los factores inmunitarios de la leche y por la respuesta inflamatoria. La dirección natural del flujo de leche a lo largo de los conductos, cuando se extrae eficazmente, eliminaría cualquier organismo hacia el exterior del pecho. El vaciamiento ineficaz de la leche, que conduce a la acumulación de ésta, origina unas condiciones favorables para el crecimiento bacteriano, superando así los procesos antiinfecciosos.

En el caso de no producirse una extracción eficaz de la leche, lo más probable es que la mastitis no infecciosa progrese a mastitis infecciosa, y esta a su vez hacia la formación de un absceso.

Desde el punto de vista fisiopatológico, las bacterias se disponen en forma de películas biológicas (biofilms) en el epitelio de los acinos y conductos galactóforos. Si la concentración bacteriana rebasa los límites biológicos, la luz de los conductos se reduce, aumentando de esta manera la presión ejercida por la leche sobre el epitelio. Como consecuencia de ello, cuando se va acumulando la leche en los conductos o cuando se produce la eyección de esta, se siente un dolor intenso en forma de “pinchazos” (Fig. 4).

A nivel microbiológico, los principales agentes etiológicos de mastitis infecciosa pertenecen a dos géneros, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. Los estafilococos son, con diferencia, las bacterias mayormente implicadas (75% de los casos), siendo entre ellos el prototipo de especie causante de mastitis el *Staphylococcus aureus*.

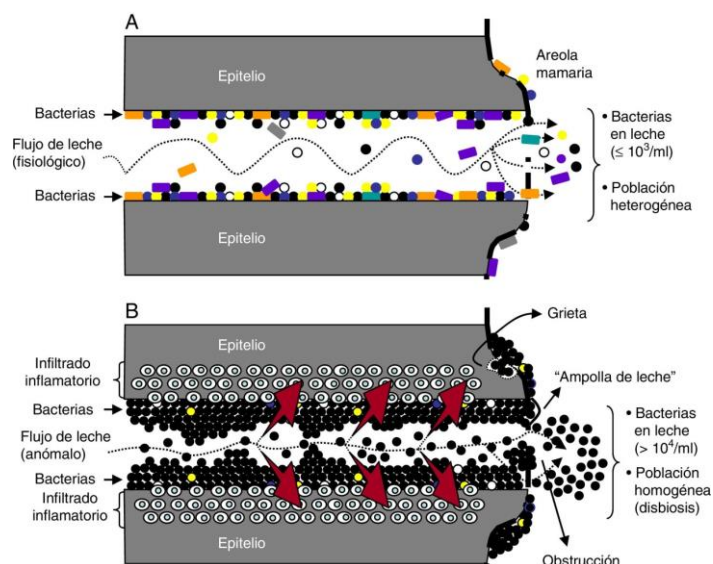


Figura 4. Representación esquemática del epitelio y los conductos mamarios en condiciones fisiológicas (A) y en situación de mastitis (B). Las flechas indican el aumento de presión de la leche a pasar por una luz disminuida.

Por último, en cuanto al tratamiento realizado en pacientes con mastitis, mencionar que consiste principalmente en la eliminación eficaz de la leche, analgesia y terapia antibiótica con amoxicilina.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVO

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

La mastitis modifica el estado oxidativo de la leche materna.

Para comprobar la hipótesis planteada, se establece un objetivo general y dos objetivos específicos.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar si el estado inflamatorio de la mastitis altera el estado oxidativo de la leche con respecto a madres sanas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. **Estudio del daño oxidativo a macromoléculas como proteínas mediante los CGC, y lípidos mediante el MDA.**
2. **Estudio de algunos componentes de defensa antioxidante como la actividad GPx y los polifenoles totales**

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

1.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio observacional cuyo diseño experimental, incluyendo el tamaño muestral y los grupos a comparar se describen con detalle en el siguiente apartado.

1.2. Población de estudio y ámbito

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

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:

1.2.1. Criterios de inclusión

- a) Madres sanas de un hijo sano a término con peso adecuado para la edad gestacional, mayor de 21 días, que alimentan a su hijo/a con lactancia materna exclusiva, no fumadoras, no consumidoras de tóxicos, con estado nutricional normal y sin restricciones dietéticas específicas.
- b) Que entendieran y hablaran español y aceptaran las condiciones del estudio.

1.2.2. Criterios de exclusión

- a) Madres con alguna patología asociada.
- b) En tratamiento con medicación en el momento de la obtención de la muestra.
- c) Necesidades dietéticas especiales.

Se tomó una muestra de leche 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 problemas de dolor en la mama ni en el pezón.
- **Grupo M (mastitis):** Madres que cumplen los criterios de inclusión del estudio y que presentan sintomatología dolorosa en la mama que no mejora tras asegurar un buen enganche al pecho y que no presentan grietas ni abscesos.

1.3. Tamaño muestral

Realizamos el cálculo del tamaño muestral en base a la diferencia esperada en la capacidad antioxidante total de la leche materna para un error alfa del 20% y un error beta del 10%. Se obtuvo un tamaño muestral necesario de 30 madres. Por ello, en nuestro estudio participaron un total de 30 madres, 15 sanas y 15 con mastitis.

1.4. Requerimientos éticos y consentimiento informado

Al invitarlas a participar, las madres fueron informadas de las condiciones y posibles inconvenientes derivados de su participación en el estudio verbalmente y por escrito, firmando así el consentimiento informado adjunto en el 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.

1.5. Procedimiento

Durante el estudio hubo una sola visita 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, procediendo de la siguiente forma

- Captación: Informe sobre objetivos del estudio, características y exigencias de la participación.
- Firma de consentimiento informado por las madres.
- Recogida de somatometría de la madre: peso y talla.
- Asignación a cada uno de los dos grupos.
- Recogida de una muestra de leche.

2. Métodos

2.1. Ensayos con muestras de leche materna

2.1.1. Recogida, transporte, conservación y procesado de las muestras

Se tomaron muestras de leche de las madres con y sin mastitis. La recogida de la muestra se realizó bajo condiciones estándar de extracción de la leche, utilizando un sacaleches eléctrico Medela, proporcionado por la casa Medela. Cada madre recogió tres tubos o alicuotas (5-10mL/alicuota) destinadas a las determinaciones del metabolismo oxidativo. Estas muestras se congelaron de forma inmediata hasta su recogida y se transportaron 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 en el proceso de análisis de las muestras.

2.1.2. Estado oxidativo. Análisis de laboratorio

2.1.2.1. Estudio del daño inducido a macromoléculas en la leche materna

a. Determinación de MDA por HPLC

Para la cuantificación del MDA de las muestras de leche, se utiliza una modificación del método de Richard et. al. (48) modificada por el grupo de investigación de Romero et. al. (49), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el MDA con el ácido tiobarbiturico (TBA), en base a la reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA.

En primer lugar, preparamos una fase móvil con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtromembrana de $0,45\ \mu\text{m}$ de poro y 47 mm de diámetro.

En segundo lugar, preparamos una solución madre de calibración a partir de la cual prepararemos la curva patrón. Dicha solución madre se prepara diariamente y consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol absoluto.

Por otro lado, preparamos la solución de trabajo, que consiste en una preparación de TBA (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

Por último, en tubos de vidrio de 2 ml se pipetea 0.1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación, se mezclan bien y se mantienen 60 minutos en un baño de agua a 95°C . Pasado este tiempo se enfrían los tubos a 4°C durante 10 minutos con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 12.000 rpm.

Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza unos minutos antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de neutralizar se centrifuga durante 1 minuto para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de HPLC.

La columna cromatografía de separación empleada en el HPLC es una Kromasil C18 5 μm de 250 x 4,6 mm. El flujo de la fase móvil es de 1 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553 nm. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 sg.

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,25; 0,5; 1 y 2 μM). El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por interpolación en la recta de regresión obtenida con los estándares (Fig.5)

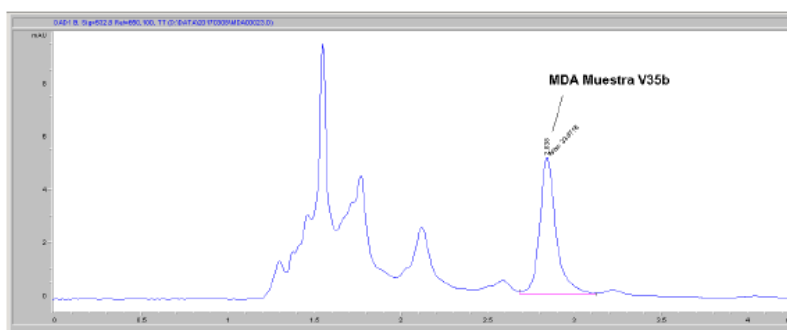


Figura 5. Ejemplo de un cromatograma de la determinación de MDA

b. Determinación del contenido de grupos carbonilo en proteínas

La oxidación proteica se mide por la cuantificación de los grupos carbonilo formados durante la incubación con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNFH) en condiciones ácidas, basándose en la reacción equimolar entre ellos, según el procedimiento desarrollado por Levine et al. (1980) con algunas modificaciones de Tian et al. (1998). La DNFH unida a proteínas se cuantifica colorimétricamente tras la separación de las proteínas derivatizadas por precipitación con ácido, lavado y posterior solubilización con guanidina.

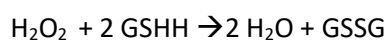
Tomamos 800 μL de leche y los centrifugamos a 13600 rpm durante 10 minutos. A 200 μL del sobrenadante se añadieron 400 μL de DNFH 10 mM /ClH 2,5 M (muestras) y a 200 μL de sobrenadante se añadieron 400 μL de ClH 2,5 M (blancos). Incubamos 1 hora a temperatura ambiente, con agitación ocasional. Centrifugamos a 12600 rpm durante 3 minutos y añadimos 1 mL de ácido tricloroacético (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 $\lambda = 373$ nm frente a una solución de guanidina. Para los cálculos restamos a la absorbancia de la muestra la del blanco.

2.1.2.2. Determinación de la defensa antioxidante

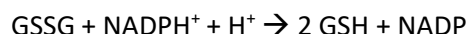
a. Actividad glutation peroxidasa (GPx)

La GPx se determinó según el método propuesto por Lawrence (50) frente al H_2O_2 . Está basado en las siguientes reacciones:

GSH Peroxidasa



GSH Reductasa



La formación del GSSG esta catalizada por la actividad GPx de la muestra, que es, a su vez, reducido de forma continua por un exceso de la actividad GSH reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación de NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.

Las soluciones empleadas fueron las siguientes:

- Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.2, que contiene ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 1 mM y azida sódica 1 mM.
- Solución B. GSH reductasa 2.4 U/mL.
- Solución C. GSH 10 mM
- Solución D. NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO_3 al 0.1%.
- Solución E. H_2O_2 1.5 mM

El procedimiento analítico consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

1. 550 µl de la solución A (tampón fosfato potásico).
2. 50 µl de muestra.
3. 100 µl de la solución de GSH reductasa (solución B).
4. 100 µl de la solución C.

Estas soluciones se preincuban durante 5 min a 37°C, tras lo cual se añaden 100 µl de la solución D. Posteriormente el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos es monitorizado en un espectrofotómetro durante 3 min. Finalmente, se añaden 100 µl de la solución E, y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min, que es resultado del consumo de NADPH.

El cálculo se realizó por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido:

$$C = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (\text{mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1})$$

Donde:

V_f = volumen final en ml

V_m = volumen de muestra en ml

ε = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de 6.22 mM⁻¹ x cm¹)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

ΔA = disminución de la absorbancia a 340 nm

Δt = intervalo de tiempo considerado

Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

b. Determinación del contenido de polifenoles totales en la leche (método de Folin-Ciocalteu)

Para medir el contenido total en polifenoles en las muestras de leche materna, se utilizó el método de Folin-Ciocalteu (51), que se basa en la oxidación de los polifenoles con el reactivo de Folin (mezcla de fosfomolibdenato y fosfotungstenato). Al mezclar la muestra de leche con el reactivo, se consigue la formación de un complejo azul cuya absorbancia se midió espectrofotométricamente a 750 nm.

Las muestras de leche descongeladas se centrifugaron a 12000g durante 5 minutos. A continuación, se tomaron 500 μ L de sobrenadante y se añadieron 100 μ L de ácido metafosfórico 1.32 M para precipitar completamente las proteínas, se centrifugo a 2700 rpm durante 3 minutos y se recogió el sobrenadante. Se tomaron 20 μ l del sobrenadante y se añadieron 80 μ l de agua destilada y 500 μ l del reactivo de Folin-Ciocalteu (1/10) diluido, la mezcla se agito con un vortex durante 2 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 μ L de la solución de carbonato de sodio al 7.5%, se agito 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.

3. Análisis estadístico

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

Realizamos en primer lugar un análisis descriptivo de cada variable estudiada y estudiamos la normalidad de sus distribuciones con el test de Shapiro-Wilk. Se establecieron los valores con significaciones estadística aquellos con una $p < 0.05$. La medida de tendencia central utilizada en el presente trabajo ha sido la media aritmética. La medida de dispersión de los datos utilizada fue el error estándar de la media.

Para analizar los valores de las diferentes variables presentadas se ha utilizado la prueba de T-student para datos independientes, que nos permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias.

IV. RESULTADOS

1. Estudio del daño oxidativo inducido a macromoléculas en la leche materna

a. Determinación del CGC en leche

Se observa que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre los CGC de madres sin mastitis con respecto a las madres con mastitis (Fig.6).

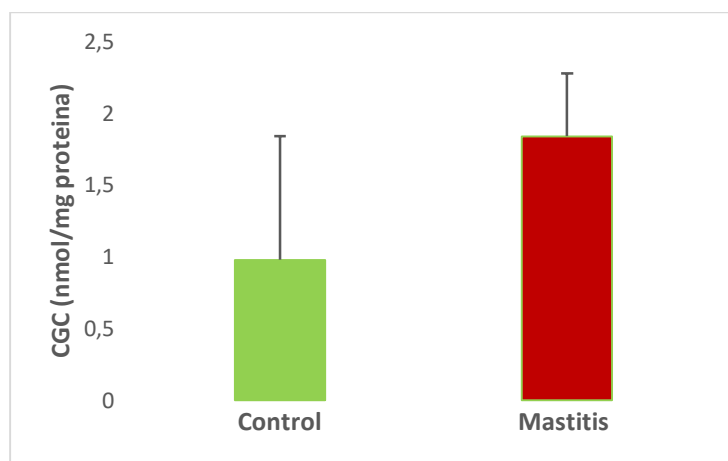


Figura 6. Efecto de la mastitis sobre la concentración de GC. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar.

b. Determinación de la concentración de MDA en leche

Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de MDA obtenidos en la muestra de leche en madres sin mastitis con respecto a la de madres con mastitis (Fig.7).

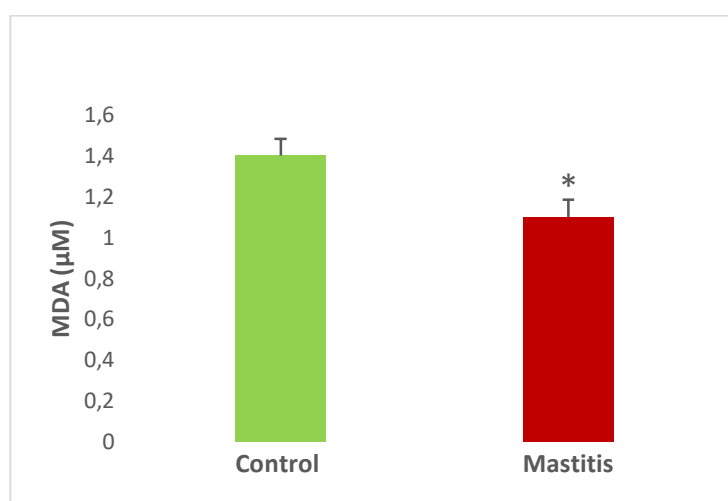


Figura 7. Efecto de la mastitis sobre la concentración de MDA. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs Control

2. Estudio del contenido antioxidante en la leche materna

a. Determinación de la concentración de GPx en leche

Se observa que hay una diferencia estadísticamente significativa de los valores de GPx obtenidos entre las muestras de leche en madre sin mastitis y con mastitis (Fig.8).

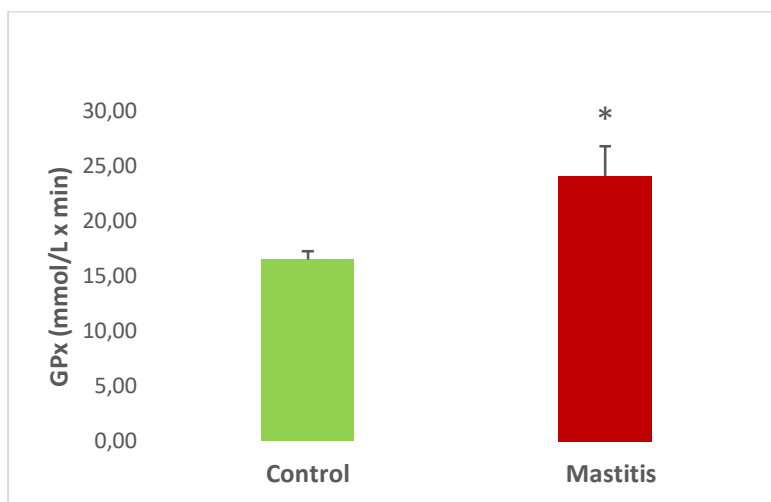


Figura 8. Efecto de la mastitis sobre la concentración de GPx. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs Control

b. Determinación de la concentración de polifenoles en la leche

Se observa que hay diferencias estadísticamente significativas entre los valores de polifenoles en la leche de madres sin mastitis con respecto a las de con mastitis (Fig. 9).

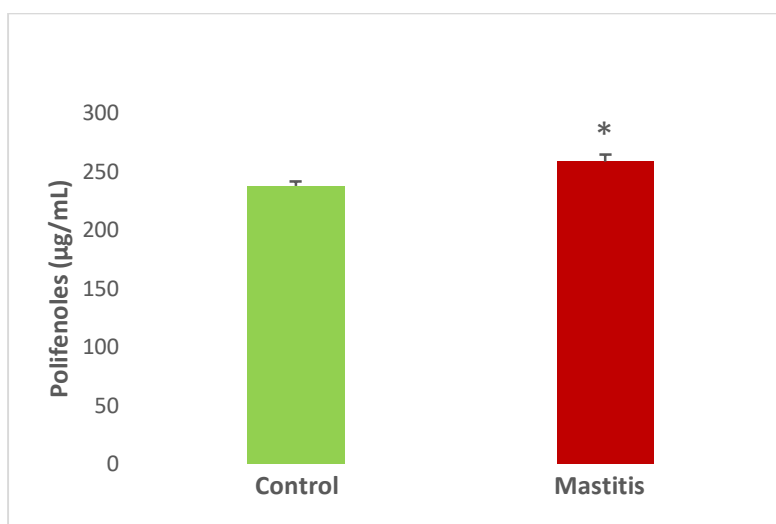


Figura 9. Efecto de la mastitis sobre la concentración de polifenoles totales. Los resultados están expresados en media \pm desviación estándar. * $p < 0,05$ vs Control

V. DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo es analizar el efecto que tiene la mastitis sobre el estado oxidativo de la leche materna. Para ello hemos analizado dos parámetros de daño oxidativo a macromoléculas, el CGC y el MDA, y dos parámetros de defensa antioxidante, la actividad GPx y los polifenoles totales.

1. Estudio del daño inducido a macromoléculas en leche materna

- **Determinación del CGC en proteínas**

La determinación del CGC está reconocida como un buen marcador de daño oxidativo a proteínas (52).

Al analizar los resultados del CGC en la leche se observa que no hay diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo mastitis (Fig. 5). De esta manera, no hay evidencias de que en la leche de madres con mastitis aumente el daño oxidativo a proteínas.

En la actualidad, no existen estudios científicos que describan el daño oxidativo a proteínas en leche inducido por mastitis. No obstante, si se ha estudiado el efecto de la suplementación de la dieta de madres lactantes con antioxidantes, observándose una disminución en el CGC de la leche (53).

- **Determinación de la concentración de MDA en leche**

El MDA es el principal producto de la peroxidación lipídica, siendo el incremento de su concentración indicativo de una posible situación de estrés oxidativo (54). Dado que el MDA se produce debido a una alteración en la composición lipídica, los estudios de las variaciones en su concentración podrían ser útiles para conocer el grado de alteración de la fracción lipídica de la leche materna.

Se ha demostrado que los tratamientos térmicos de la leche inducen un incremento de la peroxidación lipídica (55,56). En concreto, se ha puesto de manifiesto que cuando la leche es almacenada a -80°C por periodos superiores a 30 días aumenta la concentración de MDA significativamente con respecto a la concentración observada en leche fresca (56). Por ello en nuestro estudio todas las muestras fueron procesadas antes de transcurrir 30 días desde su recogida y almacenamiento a -80°C , para garantizar que la congelación no afectara a la concentración de MDA y sus posibles diferencias entre los distintos grupos.

De esta forma, sorprende que al estudiar la concentración de MDA se observe que la leche de las madres con mastitis tiene menor grado de peroxidación lipídica que la leche de las madres sanas (Fig.6). No existen estudios de la concentración de MDA en leche de madres con mastitis. Sin embargo, sí se ha descrito un aumento de la concentración de MDA en la leche de otras especies animales con mastitis (57-59).

Por otro lado, también sorprende que sabiendo que los lípidos son unas de las macromoléculas más sensibles al daño oxidativo, encontremos una disminución de la peroxidación lipídica en madres con mastitis. En un estudio realizado recientemente, en el que se analiza el contenido de macronutrientes en la leche de madres con mastitis, se ha observado que hay una considerable disminución del contenido en lípidos e hidratos de carbono frente al observado en las madres sanas (60). Estos resultados podrían justificar una menor peroxidación lipídica a pesar de que los lípidos sean más sensibles al daño oxidativo.

2. Estudio de la capacidad antioxidante de la leche

- **Determinación de la GPx**

Dentro de las propiedades antioxidantes presentes en la leche materna, cabe destacar el papel protector de la GPx frente a la peroxidación lipídica. Tal y como ocurría con el MDA, se ha descrito que la congelación puede afectar a la actividad GPx (54). En nuestro estudio todas las muestras fueron procesadas antes de transcurrir 30 días desde su recogida y almacenamiento a -80°C , para garantizar que la congelación no afecta a la actividad GPx y sus posibles diferencias entre los distintos grupos.

En los resultados obtenidos al medir la actividad de la GPx, se observa que ésta es significativamente mayor en la leche de las madres con mastitis frente a las de control (Fig.7). Estas diferencias podrían deberse al mecanismo compensatorio en el que el organismo trata de hacer frente a la mastitis incrementando la síntesis y/o actividad de sus antioxidantes naturales (61,62). Estos mecanismos compensatorios son característicos al inicio de un insulto oxidativo. Primero el organismo responde aumentando las defensas antioxidantes, evitando así el daño oxidativo, pero estos mecanismos no pueden mantenerse a lo largo del tiempo. En caso de haber alargado nuestro estudio y haber tomado una muestra de leche pasados los 21 días podríamos haber encontrado que dichas defensas han disminuido, estableciéndose así una situación de estrés oxidativo, caracterizada por una disminución de defensas y aparición de daño oxidativo a macromoléculas.

Actualmente no existe ningún trabajo que valore la actividad GPx en leche humana de madres con mastitis. No obstante, sí existen otros trabajos realizados en leche y plasma de animales con mastitis en los que la GPx está disminuida (63-65). Posiblemente estas diferencias se deban a un comportamiento distinto de esta enzima en otras especies o a que no se recogieron las muestras en el mismo momento de evolución de la enfermedad.

- **Determinación de la concentración de polifenoles totales**

Los resultados obtenidos sobre el contenido de polifenoles totales muestra que su contenido es significativamente mayor en las madres con mastitis (Fig. 8). Al igual que se ha explicado anteriormente, este aumento de polifenoles podría deberse a un mecanismo fisiopatológico de compensación, consistente en una mayor producción de antioxidantes para defenderse del estrés oxidativo inducido por la mastitis (61,62).

Los polifenoles representan un importante papel en múltiples procesos biológicos al poseer propiedades antioxidantes, antiinflamatorias e inmunológicas. A pesar del interés creciente sobre el estudio del contenido en polifenoles de distintos alimentos, en la actualidad existen pocos datos en la literatura sobre su concentración en leche materna.

Destacar también que a día de hoy no podemos comparar nuestros datos con los de otros trabajos, porque no hay estudios en los que se determine el contenido total de polifenoles en leche con mastitis. A pesar de que no hay ningún trabajo ni en humanos ni en animales que estudie el contenido de polifenoles en leche con mastitis, sí que se ha demostrado que los polifenoles son capaces de mejorar el proceso inflamatorio de la mastitis (66).

VI. LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Una limitación que nos encontramos en este trabajo es que al haber abandonos a lo largo del estudio la n se ha reducido afectando posiblemente a la significación de algunos resultados.

La segunda limitación tiene que ver con la duración del estudio. Es probable que se hubieran encontrado más resultados estadísticamente significativos si se hubiera seguido a las madres durante más tiempo.

Por último, otra de las limitaciones existentes es la usencia de literatura, dificultando así la comparación de los resultados obtenidos.

VII. CONCLUSIONES

En relación a los objetivos específicos planteados en este estudio, se concluye que:

- a. No se observa diferencias significativas en los valores de CGC en relación a la leche de madres sanas con respecto a las madres con mastitis. Sí que se observa diferencias en los valores de MDA, siendo mayores en las madres sanas, posiblemente debido a la diferencia de contenido lipídico entre ambos grupos, siendo menor en el grupo mastitis.
- b. La mastitis induce un aumento de algunos componentes de la defensa antioxidante, como los polifenoles o la actividad GPx.

Por lo tanto, la conclusión final de este estudio es que la mastitis tiene efecto sobre el estado oxidativo de la leche humana. No podemos concluir que se haya establecido una situación de estrés oxidativo, pero sí parece haber una respuesta compensatoria frente a un posible insulto oxidativo.

VIII. AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme inculcado que una gran recompensa requiere de un gran esfuerzo, por su amor incondicional y todo su esfuerzo para hacer de mí todo lo que soy hoy. A mi hermana y a mis amigos María, Carmen y Sergio, por ser el hombro donde llorar y la energía para continuar ante las adversidades. A Hamid, por confiar siempre en mí, incluso cuando ni yo misma lo hago, y por acompañarme y cuidarme durante estos seis años. A mi grupo de amigos por ser hogar, paz y diversión cuando más lo necesitaba. A mis cuatros abuelos por cuidarme desde cielo. A mis tutores María, Pablo y Ricard, por su dedicación y trabajo.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol Chem.* [Internet] 1997;272(33):20313–6. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.33.20313>
2. Miranda M, Muriach M, Roma J, Bosch-Morell F, Genovés JM, Barcia J, et al. Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental II: utilidad de agentes secuestrantes de peroxinitritos. *Arch Soc Esp Oftalmol.* [Internet] 2006;81(1):27–32. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.4321/s0365-66912006000100007>
3. Burton GJ, Jauniaux E. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* [Internet] 2011;25(3):287–99. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>
4. Hausladen A, Stamler JS. Nitrosative stress. *Methods Enzymol.* [Internet] 1999;300:389–95. Recuperado a partir de: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(99\)00143-3](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(99)00143-3)
5. Dröse S, Brandt U. Molecular mechanisms of superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Adv Exp Med Biol.* [Internet] 2012;748:145–69. Recuperado a partir de: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-3573-0_6
6. Halliwell B. Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans.* [Internet] 2007;35(Pt 5):1147–50. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1042/BST0351147>
7. Hardy K, Hunt NH. Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med.* [Internet] 2004;37(10):1550–63. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.07.020>
8. Fillebeen C, Pantopoulos K. Redox control of iron regulatory proteins. *Redox Rep.* [Internet] 2002;7(1):15–22. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1179/135100002125000136>
9. Sies H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med.* [Internet] 1991;91(3C):31S-38S. Recuperado a partir de: [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(91\)90281-2](https://doi.org/10.1016/0002-9343(91)90281-2)
10. Young IS, Woodside JV. Antioxidants in health and disease. *J Clin Pathol.* [Internet] 2001;54(3):176–86. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1136/jcp.54.3.176>
11. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med.* [Internet] 1991;11(1):81–128. Recuperado a partir de: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(91\)90192-6](https://doi.org/10.1016/0891-5849(91)90192-6)
12. Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med.* [Internet]

- 1990;9(6):515–40. Recuperado a partir de: [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(90\)90131-2](https://doi.org/10.1016/0891-5849(90)90131-2)
13. Stadtman ER, Levine RL. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins. *Amino Acids*. [Internet] 2003;25(3–4):207–18. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1007/s00726-003-0011-2>
 14. Albertini R, Rindi S, Passi A, Bardoni A, Salvini R, Pallavicini G, et al. The effect of cornea proteoglycans on liposome peroxidation. *Arch Biochem Biophys*. [Internet] 1996;327(2):209–14. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1006/abbi.1996.0111>
 15. Duan J, Kasper DL. Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species. *Glycobiology*. [Internet] 2011;21(4):401–9. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1093/glycob/cwq171>
 16. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal oxidative damage to mitochondrial and nuclear DNA is extensive. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Internet] 1988;85(17):6465–7. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1073/pnas.85.17.6465>
 17. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*. [Internet] 1993;90(17):7915–22. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.7915>
 18. Halliwell B. Free radicals and antioxidants: updating a personal view. *Nutr Rev*. [Internet] 2012;70(5):257–65. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2012.00476.x>
 19. Nathan C. Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling. *J Clin Invest*. [Internet] 2003;111(6):769–78. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1172/JCI18174>
 20. Shah MD, Shah SR. Nutrient deficiencies in the premature infant. *Pediatr Clin North Am*. [Internet] 2009;56(5):1069–83. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2009.08.001>
 21. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol*. [Internet] 2012;2012:936486. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1155/2012/936486>
 22. Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem*. [Internet] 1983;52(1):711–60. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
 23. Powers SK, Radak Z, Ji LL. Exercise-induced oxidative stress: past, present and future. *J Physiol*. [Internet] 2016;594(18):5081–92. Recuperado de: <https://doi.org/10.1113/JP270646>

24. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. [Internet] *Nutr Rev.* 1998;56(11):317–33. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.1998.tb01670.x>
25. Ballard O, Morrow AL. Human milk composition: nutrients and bioactive factors. *Pediatr Clin North Am.* [Internet] 2013;60(1):49–74. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.pcl.2012.10.002>
26. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* [Internet] 2007;37(1):7–36. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.cppeds.2006.10.002>
27. Andreas NJ, Kampmann B, Mehring Le-Doare K. Human breast milk: A review on its composition and bioactivity. *Early Hum Dev.* [Internet] 2015;91(11):629–35. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2015.08.013>
28. Wojcik KY, Rechtman DJ, Lee ML, Montoya A, Medo ET. Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *J Am Diet Assoc.* [Internet] 2009;109(1):137–40. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.jada.2008.10.008>
29. Ares Segura S, Arena Ansótegui J, Díaz-Gómez NM, en representación del Comité de Lactancia Materna de la Asociación Española de Pediatría. La importancia de la nutrición materna durante la lactancia, ¿necesitan las madres lactantes suplementos nutricionales? *An Pediatr (Barc).* [Internet] 2016;84(6):347.e1-7. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.anpedi.2015.07.024>
30. Newburg DS, Grave G. Recent advances in human milk glycobiology. *Pediatr Res.* [Internet] 2014;75(5):675–9. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1038/pr.2014.24>
31. Lonnerdal B. Nutritional and Physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr.* [Internet] 2003; 77(suppl): 1537S–1543S. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1093/ajcn/77.6.1537S>
32. Lonnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr.* [Internet] 2010; 156 (2 suppl): S26-S30. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.11.017>
33. Delplanque B, Gibson R, Koletzko B, Lapillonne A, Strandvik B. Lipid quality in infant nutrition: Current knowledge and future opportunities. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* [Internet] 2015;61(1):8–17. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000000818>

34. Lee JW, Davis JM. Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr.* [Internet] 2011;23(2):161–6. Recuperado a partir de:
<https://doi.org/10.1097/MOP.0b013e3283423e51>
35. Li W, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T. Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk. *Nutrition.* [Internet] 2009;25(1):105–14. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.nut.2008.07.017>
36. IOM, Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. *Dietary Reference Intakes: Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids.* Washington, DC: National Academy Press; 2000.
37. Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine,* [Internet] 2010; 15: 191-195. Recuperad a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.siny.2010.04.001>
38. Davies KJ. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochem Soc Symp.* [Internet] 1995; 61:1-31. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1042/bss0610001>
39. 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 72 h of life. *Free Radic Res.* [Internet] 2003;37(3):317–22. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1080/1071576021000050438>
40. Silvestre D, López MC, March L, Plaza A, Martínez-Costa C. Bactericidal activity of human milk: stability during storage. *Br J Biomed Sci.* [Internet] 2006;63(2):59–62. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1080/09674845.2006.11732721>
41. Otten JJ, Hellwig JP, Meyers LD. National Academy of Sciences. *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements.* Eds. New York, 2006. ISBN0-309-65646-X.
42. Foxman B, D'Arcy H, Gillespie B, Bobo JK, Schwartz K. Lactation mastitis: occurrence and medical management among 946 breastfeeding women in the United States. *Am J Epidemiol.* [Internet] 2002; 155: 103-114. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1093/aje/155.2.103>
43. Jahanfar S, Ng CJ, Teng CL. Antibiotics for mastitis in breastfeeding women. *Sao Paulo Med J.* [Internet] 2016;134(3):273. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1590/1516-3180.20161343T1>
44. Diaz NM. Retencion y mastitis. En: *Lactancia materna: guia para profesionales.* Monografias de la Asociacion Espanola de Pediatria. [Internet].Madrid: Ergon, 2004. Recuperado a partir de:

- https://www.ministeriodosalud.go.cr/gestores_en_salud/lactancia/CNLM_guia_de_lactancia_materna_AEP.pdf
45. Hughes LE, Mansel RE, Webster DJT. Infection of the breast. Benign disorders and diseases of the breast. Londres, Bailliere Tindal, 1989:143-149.
 46. Minchin MK. *Breastfeeding Matters*, 4a ed. Australia, Alma Publications, 1998 (pp.151-165).
 47. Amir LH, Harris H, Andriske L. An audit of mastitis in the emergency department. *J Hum Lact.* [Internet] 1999;15(3):221–4. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1177/089033449901500312>
 48. Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde—thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J chromatogr.* [Internet] 1992;577(1):9–18. Recuperado a partir de: [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80593-f](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80593-f)
 49. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med.* [Internet] 1998;25(9):993–7. Recuperado a partir de: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00118-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00118-X)
 50. Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: Its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr.* [Internet] 1978;108(6):981–7. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1093/jn/108.6.981>
 51. Singleton VL, Orthofer R, Lamuela-Raventós RM. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: *Oxidants and Antioxidants Part A*. San Diego, CA: Elsevier; [Internet] 1999. p. 152–78. Recuperado a partir de: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)99017-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1)
 52. Stadtman ER, Berlett BS. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol.* [Internet] 1997;10(5):485–94. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1021/tx960133r>
 53. 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. *Breastfeed Med.* [Internet] 2013;8(2):164–9. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1089/bfm.2012.0059>

54. Halliwell B. Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. *Antioxidants in Diabete Management* 2000; pp 33-52.
55. Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Bosch-Morell F, Romero FJ, et al. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors*. [Internet] 2004;20(3):129–37. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1002/biof.5520200302>
56. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Frozen breast milk at -20 degrees C and -80 degrees C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. *J Hum Lact*. [Internet] 2010;26(1):35–41. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1177/0890334409342987>
57. Li-Li L, Qingzhang L. Oxidative damage and changes of antioxidant defense system in mastitis goat during lactation. *Chin Dairy Industry*. 2009;37(5):1–5.
58. El-Deeb WM. Clinicobiochemical investigations of gangrenous mastitis in does: immunological responses and oxidative stress biomarkers. *J Zhejiang Univ Sci B*. [Internet] 2013;14(1):33–9. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1631/jzus.B1200123>
59. Eslami H, Batavani RA, Asr I-Rezaei S, Hobbenaghi R. Changes of stress oxidative enzymes in rat mammary tissue, blood and milk after experimental mastitis induced by *E. coli* lipopolysaccharide. *Vet Res Forum*. 2015 Spring;6(2):131–6.
60. Say B, Dizdar EA, Degirmencioglu H, Uras N, Sari FN, Oguz S, et al. The effect of lactational mastitis on the macronutrient content of breast milk. *Early Hum Dev*. [Internet] 2016;98:7–9. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.earlhumdev.2016.03.009>
61. Chevari S, Andial T, Benke k, Shtrenger Ia. Free radical reactions and cancer. *Vopr Med Khim*, 1992. 38 (5):4-5.
62. Gonzalez-Parraga P, Hernandez JA, Arguelles JC. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H₂O₂ and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast*, [Internet] 2003; 20(14):1161-9. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1002/yea.1029>
63. Atroshi F, Tyopponen J, Sankari S, Kangasniemi R, Parantainen J. Possible roles of vitamin E and glutathione metabolism in bovine mastitis. *Int J Vitam Nutr Res*. 1987; 57(1): 37-43
64. Mukherjee R. Selenium and vitamin E increases polymorphonuclear cell phagocytosis and antioxidant levels during acute mastitis in riverine buffaloes. *Vet Res Commun*.

- [Internet] 2008;32(4):305–13. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1007/s11259-007-9031-9>
65. Dimri U, Sharma MC, Singh SK, Kumar P, Jhambh R, Singh B, et al. Amelioration of altered oxidant/antioxidant balance of Indian water buffaloes with subclinical mastitis by vitamins A, D3, E, and H supplementation. Trop Anim Health Prod. [Internet] 2013;45(4):971–8. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0319-6>
66. Ruifeng G, Yunhe F, Zhengkai W, Ershun Z, Yimeng L, Minjun Y, et al. Chlorogenic acid attenuates lipopolysaccharide-induced mice mastitis by suppressing TLR4-mediated NF- κ B signaling pathway. Eur J Pharmacol. [Internet] 2014;729:54–8. Recuperado a partir de: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.01.015>

X. ANEXO 1

HOJA DE INFORMACIÓN AL PACIENTE

Se le invita a participar en un estudio sobre la lactancia materna titulado: **Estudio del estado oxidativo de la leche humana 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 la mastitis es capaz de interferir en 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 mastitis: madres con mastitis, que alimentan a su hijo o hija con lactancia materna exclusiva.

Solicitamos su colaboración en este estudio y le pedimos que nos permita obtener una muestra de leche de unos 15ml aproximadamente. Por tanto, usted deberá realizar sólo una visita.

Si acepta participar en el estudio, usted será asignada a uno de los grupos anteriormente descritos, dependiendo de sus características clínicas. Para poder entrar en el estudio usted

debe 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 “Estudio del estado oxidativo de la leche humana 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.

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:
 - 1º- Cuando quiera
 - 2º- Sin tener que dar explicaciones
 - 3º- 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

XI. ANEXO 2



**INFORME COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA HOSPITAL GENERAL
UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ**

Dofia Georgina Queral Capdevila, Secretaria del Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital General Universitario de Castelló,

CERTIFICA

Que el Comité Ético de Investigación Clínica del HOSPITAL GENERAL UNIVERSITARIO DE CASTELLÓ 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	Dª Amparo Barrada Aznar Farmacéutica Atención Primaria
Vicepresidente	D. Emilio Ibáñez Benages Farmacéutico Hospitalario
Secretaria	Dª Georgina Queral Capdevila Miembro ajeno a la profesión sanitaria.Licenciada en Derecho
Vocales	Dª 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 Dª Amparo Ferrandiz Selles Jefe de Servicio UCI

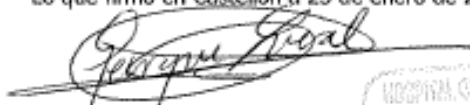
D^a Pilar Mon Carro
Diplomada en Enfermería
D. Guillermo Mena Pinilla
Facultativo Especialista en Medicina Preventiva y Salud Pública.
D. Antonio Palau Canos
Facultativo Especialista Medicina Digestiva

D^a María 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
Secretaría



XII. ANEXO 3



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



Edo.: Pilar Codoñer Franch

