



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**DEFENSAS ANTIOXIDANTES EN LECHE MATERNA EN
RELACIÓN AL TIPO DE ALIMENTACIÓN, NÚMERO DE
GESTAS Y EDAD DE LAS MADRES**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

Presenta

Patricia Carolina Castillo Castañeda

La Paz, Baja California Sur, Junio de 2013

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 10 horas del día 11 del Mes de Junio del 2013, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Defensas antioxidantes en leche materna en relación al tipo de alimentación, número de gestas y edad de las madres”


Presentada por el alumno:


Patricia Carolina Castillo Castañeda

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA


Dra. Tania Zenteno Savín
DIRECTOR DE TESIS


Dra Lia Celina Méndez Rodríguez
CO-TUTOR


Dr. Ramón Gaxiola Robles
CO-TUTOR


DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

COMITÉ TUTORIAL Y REVISOR DE TESIS

Director de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.

Co-tutor

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.

Co-tutor

Dr. Ramón Gaxiola Robles

Instituto Mexicano del Seguro Social

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. Tania Zenteno Savín

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.

Dra. Lía Celina Méndez Rodríguez

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.

Dr. Ramón Gaxiola Robles

Instituto Mexicano del Seguro Social

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.

Suplente

Dra. Elena Palacios Mechetnov

Centro de Investigaciones Biológicas de Noroeste, S. C.

RESUMEN

La leche materna suministra una combinación única y específica de nutrientes y factores inmunológicos al infante, sin importar la condición social, económica o el estado de salud de la madre. Durante el periodo de lactancia se liberan reservas corporales, para satisfacer las demandas energéticas del bebé. Adicionalmente, se producen moléculas que ayudarán a proteger las propiedades funcionales de la leche, así como al sistema de defensa del bebé, entre ellas se incluyen los antioxidantes. Entre las defensas antioxidantes se conocen compuestos de bajo peso molecular, vitaminas, y proteínas (enzimas antioxidantes). La dieta de la madre tiene una importante influencia sobre la composición de la leche y, por lo tanto, repercute tanto en el desarrollo físico como cognitivo del niño. En el presente trabajo se estudiaron tres grupos de mujeres (n=15) según el número de embarazos 1, 2 y 3 o más. Se evaluaron las defensas antioxidantes enzimáticas (SOD, CAT, GST, GPx y GR) y no enzimáticas (GSH), así como los indicadores de daño oxidativo a lípidos (TBARS) y proteínas (proteínas carboniladas) entre los grupos. Se compararon los resultados de acuerdo a la edad de las mujeres y la frecuencia de consumo de alimentos de origen marino (pescados y mariscos). No se encontraron diferencias significativas ($\alpha=0.05$) en las defensas antioxidantes ni en los indicadores de daño oxidativo entre grupos, por el número de gestas o la edad de mujeres lactantes. Se observó una correlación positiva entre la actividad de SOD y los niveles de TBARS en muestras de leche materna. Esta correlación aparentemente está afectada por la frecuencia del consumo de pescado y mariscos. El aumento en el consumo de alimentos marinos puede mejorar la calidad de las moléculas presentes en la leche materna que son necesarias para el desarrollo físico y mental del infante. Lo anterior permitirá dar la importancia apropiada a la lactancia, sobre todo en los primeros meses de vida.

Palabras clave: Alimentación, antioxidantes, daño oxidativo, leche materna

Vo.Bo.
Director de Tesis

Dra. Tania Zenteno Savín

ABSTRACT

Breast milk provides a unique and specific combination of nutrients and immune factors to the infant, regardless of social, economic, or health status of the mother. During the lactation period body reserves are released to meet the child's energy demands. Additionally, many molecules are produced to protect functional properties of breast milk, as well as to boost the infant's defense system; these molecules include antioxidants, such as low molecular weight compounds, vitamins, proteins and antioxidant enzymes. The mother's diet has an important influence on milk composition; therefore, affecting the physical and cognitive development of the child. Three groups of women were studied (n = 15) depending on the number of pregnancies 1, 2 and 3 or more. Enzymatic (SOD, CAT, GST, GPx, and GR) and non-enzymatic (GSH) antioxidants, as well as indicators of oxidative damage to lipids (TBARS) and proteins (carbonyl proteins) were analyzed. The results obtained were compared by age and frequency of seafood (fish and shellfish) consumption. No significant differences ($\alpha = 0.05$) were found in the antioxidant defenses or oxidative damage indicators among groups, according to number of pregnancies or age of lactating women. A positive correlation was found between SOD activity and TBARS levels in breast milk samples. This correlation appears to be affected by frequency of fish and shellfish consumption. The increase in seafood consumption may improve the quality of the molecules in breast milk that are necessary for the infant's physical and mental development. This information will give an appropriate context to breastfeeding, especially in the first months of life.

Keywords: Antioxidants, breast milk, feeding, oxidative damage.

DEDICADO A TODA MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número 261524 otorgada para llevar a cabo los estudios de maestría. Así como al proyecto “Respuesta antioxidante de la leche materna a la presencia de contaminación química” (FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE 140272).

Al Programa de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), y a su personal por las facilidades para realizar los estudios; así como al personal de la biblioteca, Ana María y Susana, y a Horacio del laboratorio de cómputo por tener siempre una buena actitud de servicio. A la maestra Diana Dorantes por su contribución en la redacción del resumen en inglés.

A mis asesores Dra. Tania Zenteno, por su apoyo, confianza y paciencia, a la Dra. Lía Méndez, por sus consejos y apoyo, al Dr. Ramón Gaxiola por su ayuda en estadística y su paciencia, todos contribuyeron enormemente para la realización de la tesis.

Al Laboratorio de Salud Ambiental y Biomedicina, a los técnicos Orlando Lugo y Norma Olgúin, por su paciencia y apoyo en el trabajo de laboratorio y registro de datos. A los compañeros que forman o formaron parte del grupo de estrés oxidativo durante este periodo: Myrna, Arianna, Roberto, Marcela, Lluvia, Vanessa, Angélica, Christian, Miriam, Paola, gracias por sus consejos y por hacer este tiempo más divertido.

A mis compañeros de maestría, por su amistad, su apoyo en las clases y sus consejos.

A mis padres, por confiar siempre en mí, y por su apoyo en todo lo que hago, a mis hermanos por ayudarme cuando lo he necesitado, a mi hijo, por ser el impulso que me levanta por las mañanas y me da energía para alcanzar mis metas. A mi esposo, por ser mi compañero y por ayudarme a ser más fuerte cada día.

CONTENIDO

RESUMEN EN ESPAÑOL.....	i
RESUMEN EN INGLÉS.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
CONTENIDO.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABLAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	15
3. JUSTIFICACIÓN.....	16
4. OBJETIVOS.....	16
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	16
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	17
5. HIPÓTESIS.....	17
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	17
6.1 ÁREA Y GRUPO DE ESTUDIO.....	17
6.2 TOMA DE MUESTRAS.....	18
6.3 ANÁLISIS DE LABORATORIO.....	18
6.3.1 ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	18
6.3.1.1 SUPERÓXIDO DISMUTASA (SOD).....	18
6.3.1.2 CATALASA (CAT).....	19
6.3.1.3 GLUTATIÓN PEROXIDASA (GPx).....	19
6.3.1.4 GLUTATIÓN S-TRANSFERASA (GST).....	20
6.3.1.5 GLUTATIÓN REDUCTASA. (GR).....	20
6.3.2 GLUTATIÓN.....	20
6.3.3 DAÑO OXIDATIVO.....	21
6.3.3.1 DAÑO OXIDATIVO A LÍPIDOS.....	21
6.3.3.2 DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS.....	22

6.3.4	PROTEÍNAS SOLUBLES.....	22
6.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	23
7.	RESULTADOS.....	24
7.1	ENZIMAS ANTIOXIDANTES.....	25
7.1.1	SUPERÓXIDO DISMUTASA.....	25
7.1.2	CATALASA.....	26
7.1.3	GLUTATIÓN PEROXIDASA.....	27
7.1.4	GLUTATIÓN- S-TRANSFERASA.....	28
7.1.5	GLUTATIÓN REDUCTASA.....	29
7.2	GLUTATIÓN TOTAL.....	30
7.3	DAÑO OXIDATIVO.....	31
7.3.1	PEROXIDACIÓN DE LÍPIDOS (TBARS).....	31
7.3.2	DAÑO OXIDATIVO A PROTEÍNAS.....	32
7.4	RELACIÓN ENTRE LA ALIMENTACIÓN Y LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	33
7.5	RELACIÓN ENTRE LA EDAD Y LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	34
8.	DISCUSIÓN.....	35
8.1	DEFENSAS ANTIOXIDANTES.....	35
8.2	RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE GESTAS Y LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES.....	38
8.3	RELACIÓN ENTRE EL DAÑO OXIDATIVO Y EL NÚMERO DE GESTAS.....	39
8.4	RELACIÓN ENTRE LA ALIMENTACIÓN DE ORIGEN MARINO Y LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	39
8.5	RELACIÓN ENTRE LA EDAD Y LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	42
9.	CONCLUSIONES.....	44
10.	LITERATURA CITADA.....	45
11.	ANEXOS.....	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Reacción antioxidante catalizada por superóxido dismutasa (SOD).....	10
Figura 2. Reacción catalizada por la enzima catalasa (CAT).....	10
Figura 3. Reacción catalizada por la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx)..	11
Figura 4. Mecanismo de acción del antioxidante glutatión.....	11
Figura 5. Reacción detoxificante catalizada por la enzima GST.....	12
Figura 6. Acción propuesta de algunas moléculas prooxidantes y antioxidantes en leche.....	13
Figura 7. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD, unidades miligramo ⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas.....	25
Figura 8. Actividad de la enzima catalasa (CAT, unidades miligramo ⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas.....	26
Figura 9. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx, unidades miligramo ⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas.....	27
Figura 10. Actividad de la enzima glutatión -s- transferasa (GST, unidades miligramo ⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas.....	28
Figura 11. Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR, unidades miligramo ⁻¹ de proteína soluble). en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas.....	29
Figura 12. Concentración de glutatión (GSH, nanomoles miligramo ⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas.....	30
Figura 13. Niveles de peroxidación de lípidos, cuantificados como la concentración de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS nanomoles miligramo ⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas.....	31
Figura 14. Concentración de carbonilos proteicos (micromoles gramo ⁻¹ de	

proteínas (totales) en muestras de leche materna agrupadas por número
de gestas..... 32

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Promedio de composición nutrimental de leche humana (tres etapas), leche de vaca y leche de fórmula.....	6
Tabla II. Ácidos grasos w-3, en 18 especies de pescados mexicanos de amplio consumo en México.....	9
Tabla III. Variables antropométricas de mujeres lactantes y tipo de alimentación, agrupados según el número de gestas.....	24
Tabla IV. Indicadores de estrés oxidativo en muestras de leche materna en relación a la frecuencia de consumo de pescado y mariscos.....	34

1. INTRODUCCIÓN

Al concluir el embarazo, inicia el periodo de lactancia, cuando una disminución en el nivel de estrógenos provoca la liberación de prolactina y oxitocina e inicia la función de las glándulas mamarias; es decir, la producción de leche para alimentar y proteger al niño después del nacimiento. La histología de la glándula mamaria es similar en todas las especies, está compuesta de un parénquima glandular, el cual a su vez, consta de alvéolos y conductos, así como de un estroma de soporte. Dichos alvéolos producen leche completa, mediante la síntesis y el transporte desde el plasma sanguíneo, de proteínas, grasas, hidratos de carbono, sales, anticuerpos y agua (Valdés et al., 1994).

La lactancia es una herramienta contra la desnutrición de los infantes, debido a que la leche materna proporciona una combinación única y específica de nutrientes y factores inmunológicos, con la posibilidad de renovarse continuamente, sin importar la condición social, económica o el estado de salud (Picciano, 2001). Incluso las madres desnutridas producen leche con una calidad por encima de la leche de fórmula. La lactancia tiene la ventaja de que sólo es necesario que las madres y los infantes pasen tiempo juntos, no se requiere refrigeración, almacenaje o electricidad. Además, en ocasiones la lactancia puede funcionar como método anticonceptivo (Black et al., 1998). Otras ventajas son que ayuda a evitar el hambre en los infantes en zonas de extrema pobreza, y que contiene factores específicos para la especie humana que no se encuentran en ningún otro tipo de leche (Black et al., 1998).

La leche materna consta de 3 etapas, la etapa de calostro, leche transicional y leche madura, en las que varía su composición nutrimental (Tabla I). A la primera secreción mamaria se le denomina calostro, se produce durante la primera semana posparto y consiste en un líquido amarillo y espeso, (su color se le atribuye a la presencia de β -caroteno), cuyo valor energético es de 67 kcal 100 mL⁻¹. En esta etapa, algunos nutrientes y sales se encuentran en concentraciones elevadas (Neville, 1995). El calostro contiene, además, anticuerpos que protegen contra bacterias y virus, así como moléculas antioxidantes que actúan como quelantes de especies reactivas de oxígeno (ERO) producidas por neutrófilos. En esta etapa el contenido de proteínas es elevado y el de lípidos es bajo, por lo tanto

se ajusta a las necesidades del recién nacido; aunque es buena fuente de vitaminas liposolubles, como la vitamina A, carotenoides y vitamina E (Tabla I). El contenido de vitamina A y vitamina E es tres veces mayor en el calostro que en leche madura y el contenido de carotenoides es incluso diez veces mayor en calostro (Saint et al., 1984).

La leche de transición, como su nombre sugiere, es la leche que se produce entre el calostro y la leche madura; la producción de la leche de transición inicia a partir del séptimo día y se extiende hasta la segunda semana postparto. En esta etapa disminuye la cantidad de proteínas y sales, pero la cantidad de carbohidratos (lactosa) y lípidos se incrementa, así como el contenido calórico, hasta ser aproximadamente de 75 kcal 100 mL⁻¹ (Shellhorn y Valdés, 1995). La concentración de vitaminas hidrosolubles también incrementa a lo largo de esta etapa, hasta alcanzar valores característicos de la leche madura (Tabla I); en esta última etapa, además, hay un aumento en el contenido de agua contribuyendo con la regulación de la temperatura del infante (Lawrence y Lawrence, 2007).

En la leche podemos encontrar proteínas tales como caseína y proteínas del suero de la leche (en una relación 40:60) (Lonnerdal, 1985); la caseína estimula el sistema inmune del infante (Migliore-Samour y Lolles, 1988), contribuye a la absorción de los iones de calcio y posee actividades antitrombóticas, antihipertensivas y opioides (Lonnerdal, 2003). Entre las proteínas del suero, la α -lactoalbúmina se encuentra en mayor proporción y tiene la cualidad de poseer tanto una secuencia de aminoácidos como una concentración de cisteína y triptofano suficientes para los requerimientos del infante, las cuales se consideran limitantes en fórmulas a base de leche bovina (Heine y Klein, 1991; Hanning et al., 1992; Lien, 2003). La proteína lactoferrina, que se encuentra en concentraciones elevadas en el calostro, tiene la capacidad de ligar átomos de hierro, de esta manera los microorganismos no pueden disponer de él para su propagación, ejerciendo un efecto bacteriostático en el intestino del infante, en sinergismo con inmunoglobulinas como la inmunoglobulina A secretora (IgAs).

La leche materna es rica en inmunoglobulinas (Ig), especialmente durante la etapa de calostro; la principal es la IgAs, seguida de IgA monomérica, IgG e IgM, las cuales son sintetizadas en la glándula mamaria, para formar anticuerpos capaces de unirse a

microorganismos y frenar el paso hacia la mucosa intestinal (Ronayne, 2000). Otra función muy importante de la IgAs es la de impedir que los patógenos y sus toxinas puedan adherirse al epitelio intestinal (Xanthou, 1998; Hamosh, 1998).

Otras proteínas presentes en la leche son enzimas, como la lisozima, cuya acción bactericida cataliza la ruptura de las uniones β -1,4 de la pared celular bacteriana y la enzima lipasa, que puede sobrevivir en el tracto gastrointestinal provocando la hidrólisis de los lípidos, con producción de glicerol y ácidos grasos libres; lo que provoca una alta absorción de grasas en infantes alimentados con leche materna (Lonnerdal, 1985). Además, la liberación de estos ácidos grasos protege contra protozoos, bacterias y virus, ya que poseen actividad antimicrobiana e incluso antiinflamatoria (Hamosh, 1998; Peterson et al., 1998).

En la leche materna también se encuentran componentes no proteicos, como la taurina y los nucleótidos; la deficiencia de la primera en el neonato, puede afectar la función de la retina (Gaul, 1989); los nucleótidos presentan funciones de modulación del sistema inmune, desarrollo de bifidobacterias, así como maduración gastrointestinal (Uauy, 1994).

Entre los carbohidratos se encuentra la lactosa, un disacárido que se sintetiza a partir de glucosa, y contribuye con los requerimientos energéticos necesarios para el infante, favorece además, la implantación de una flora acidófila y promueve la absorción intestinal de calcio, gracias a la actividad de la lactasa intestinal (Ronayne, 2000; Cochet et al., 1983).

Otros carbohidratos importantes son los oligosacáridos, los que debido a su estructura, pueden competir con microorganismos patógenos (Gudiel-Urbano y Goñi, 2001), incluso favorecen el desarrollo de bifidobacterias, a la vez que contribuyen a mantener un pH ácido, el cual impide la proliferación de microorganismos patógenos, por lo que los oligosacáridos ejercen un efecto prebiótico en el infante (Uauy, 1994; Gudiel-Urbano y Goñi, 2001). La estructura que presentan es similar a la de los receptores de las células del epitelio intestinal, esto se debe a que en la síntesis de los oligosacáridos intervienen enzimas semejantes a las que catalizan la síntesis de las glucoproteínas y glucolípidos, los cuales integran los receptores de la superficie celular (Kobata, 1978). Lo que provoca que

los oligosacáridos sean ligandos competitivos para bacterias, virus, hongos y protozoos, inhibiendo su colonización (Newburg, 2000). Existen más de 20 oligosacáridos en la leche materna con capacidad de unión competitiva a patógenos del tracto intestinal, respiratorio y urinario (Kunz, 1993).

Entre los minerales, el calcio (Ca) y el fósforo (P) se encuentran en una proporción de 2 a 1 (Ronayne, 2000; Caulfield et al., 1995). El Ca es necesario para el depósito óseo, contribuye a mantener el tono vascular (Herrera, 2002), y su absorción a partir de la leche materna es de 55% en comparación con 38% a partir de la leche de vaca (Poiffait, 1993). El P participa en un gran número de funciones biológicas, por ejemplo formación de huesos, metabolismo energético, mantenimiento ácido-base, actividad del sistema nervioso (Tomassi, 2002); en la leche humana el 23% del P se encuentra unido a proteínas, el resto se encuentra como P inorgánico o unido a lípidos (Harzer et al., 1986).

El hierro (Fe) es indispensable para la producción de glóbulos rojos y transporte de oxígeno; por lo tanto, interviene en el desarrollo cognitivo (Beard y Stoltzfus, 2001; Beard y Connor, 2003). En los primeros meses de vida, es importante la alimentación mediante la leche materna, ya que ésta es una buena fuente de Fe, el cual se absorbe en más del 70% (Lozzof et al. 1991).

El zinc (Zn) es esencial para el crecimiento y desarrollo del infante, interviene en el desarrollo del sistema inmune y en otros procesos fisiológicos, forma parte de algunas hormonas, y es cofactor de enzimas que intervienen en procesos metabólicos (WHO, 1996). El contenido de Zn cambia a lo largo de las etapas de lactancia (Poiffait, 1994). Se puede encontrar alrededor del 30% del Zn unido a lípidos, el 20% a la caseína y el 50% restante a componentes presentes en el suero lácteo (Bates y Tsuchiva, 1990; Casey et al., 1995).

El cobre (Cu) es necesario para el uso del Fe, interviene también como cofactor en el metabolismo de la glucosa y la síntesis de hemoglobina, tejido conectivo y fosfolípidos, la concentración de Cu en la leche materna es baja, pero no es común encontrar deficiencia de este mineral en infantes alimentados exclusivamente con leche humana (Lonnerdal, 1998). En el suero lácteo se puede encontrar el 80% del Cu, alrededor del 15% se encuentra en la grasa y el resto en la caseína (Casey et al., 1995). Su absorción a partir de la leche humana es de aproximadamente 25% (Lonnerdal, 1997).

La leche producida por mujeres con buena nutrición contiene cantidades suficientes de vitaminas para un crecimiento normal del infante (Lonnerdal, 1985). Entre estas vitaminas podemos mencionar a la vitamina D, que tiene funciones hematopoyéticas y propiedades inmunoregulatoras, es necesaria para la mineralización ósea y tiene además la capacidad de incrementar la absorción intestinal de Ca y P, así como la reabsorción de calcio en el riñón (Portela, 2003).

La vitamina K se ha relacionado con procesos de coagulación sanguínea, por lo que se recomienda en el momento del nacimiento para evitar problemas hemorrágicos durante la estabilización de la flora intestinal (Rogers, 1997).

La principal función de la vitamina C o ácido ascórbico es como antioxidante y como cofactor en reacciones enzimáticas que se llevan a cabo durante en el desarrollo de huesos y cartílagos (Gudiel-Urbano y Goñi, 2001). La vitamina C también estimula la absorción del Fe y actúa en el metabolismo de los depósitos de este mineral; por ejemplo, se ha encontrado que los fitatos pueden reducir la absorción del Fe no hemo en un 50%, lo que puede ser evitado mediante el consumo de pequeñas cantidades de carne y vitamina C, ya que impiden la formación de quelatos, provocando un aumento en su absorción, aún en presencia de inhibidores (Forrellat et al. 2000).

La vitamina A interviene en diferentes funciones biológicas, forma parte del pigmento visual rodopsina, que permite la visión en penumbra (Moreira, 1997) y es necesaria para el crecimiento y la respuesta inmune (Portela, 2003); su concentración varía en la leche, ya que depende de la dieta materna (Canfield, 1995).

La vitamina E se distingue por su función antioxidante, la cual es relevante teniendo en cuenta la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados presentes en la leche humana (Portela, 2003).

Tabla I. Promedio de composición nutrimental de leche humana (tres etapas), leche de vaca y leche de fórmula por cada 100 mL.

Nutriente	Leche humana, calostro	Leche humana, transicional	Leche humana, madura	Leche de vaca	Leche de fórmula
Agua, g	88.2	87.4	87.1	87.8	87.9
Proteína, g	2.0	1.5	1.3	3.2	1.4
Carbohidratos, g	2.6	3.7	4.1	3.9	3.6
Energía, kcal	56	67	69	66	64
Ácidos grasos saturados, g	1.1	1.5	1.8	2.4	1.4
Ácidos grasos monoinsaturados, g	1.1	1.5	1.6	1.1	1.3
Ácidos grasos poliinsaturados, g	0.3	0.5	0.5	0.1	0.6
Ca, mg	28	25	34	115	51
P, mg	14	16	15	92	28
Fe, mg	0.07	0.07	0.07	0.05	0.07
Cu, mg	0.05	0.04	0.04	Tr.	Tr.
Zn, mg	0.06	0.03	0.03	0.17	0.10
Retinol, µg	155	85	58	51	105
Vitamina D, µg	N	N	0.04	0.03	1.07
Vitamina E, mg	1.3	0.48	0.34	0.09	1.36
Vitamina C, mg	7	6	4	1	7

Tr. = trazas, N = no detectable. Modificado de las tablas de análisis de alimentos estándar usados en el Reino Unido (Emmett y Rogers, 1997).

Las grasas son fuente de energía para el infante, aportan ácidos grasos como ω -6 y ω -3, lo cuales son necesarios para conseguir una adecuada producción de eicosanoides. Los ácidos grasos oleico, palmítico y linoléico son los más abundantes en la leche materna (Gibson y Kneebone, 1981). Los ácidos grasos saturados presentes en la leche materna representan del 42 al 47% y, por otro lado, los ácidos grasos insaturados constituyen del 53 a 58% (Prentice, 1996, Ronayne, 2000). En la mielina en el tejido nervioso se puede encontrar al ácido oleico, el cual se acumula en la etapa neonatal, siendo además precursor de otros ácidos grasos, tales como los esfingolípidos de la mielina (Newburg y Neubauer,

1995). Los ácidos araquidónico y docosahexaenoico generalmente se encuentran en el cerebro y la retina del neonato, contribuyendo a su desarrollo neurológico y visual (Ronayne, 2000).

La leche contiene ácidos grasos polinsaturados (PUFA) (Sauerwald et al., 2001). Los ácidos grasos de cadena larga ω -6 y ω -3 tienen efectos sobre los mediadores eicosanoides (anti- y proinflamatorios), y ayudan a proteger la barrera epitelial intestinal promoviendo la madurez gastrointestinal en los infantes, por lo que es fundamental para las funciones inmunomoduladoras del recién nacido (Sala-Vila et al., 2008). Los PUFA de cadena larga son importantes, tanto para el crecimiento como para el funcionamiento corporal del infante (Rosenfeld et al., 2009). En el recién nacido, una dieta basada en leche materna aporta aproximadamente el 50% de la energía en forma de lípidos, y el 99% de ellos se encuentra en forma de triacilglicéridos (Mena y Milad, 1998; Sanjurjo et al., 2008; Bosch et al., 2009; Martínez et al., 2009). Así como las mujeres lactantes reciben ácidos grasos esenciales gracias a su dieta, el feto y el recién nacido los deben recibir a partir de la madre; por ello, es importante una adecuada y correcta alimentación para asegurar el mejor suministro de estos nutrientes (Valenzuela y Nieto, 2003; Campoy et al., 2010).

El depósito de ácido docosahexaenóico (DHA), tanto de la corteza cerebral como de la retina, inicia a partir de los primeros seis meses de vida intrauterina y en el tercer trimestre del embarazo, respectivamente; además, un alto porcentaje de lípidos estructurales de las células cerebrales y de las células de la retina está constituido por DHA (Valenzuela y Nieto, 2001, Hadders et al. 2007). La concentración de DHA en las membranas de los glóbulos rojos varía dependiendo de los niveles de consumo de alimentos con alto contenido de PUFA (Atalah et al., 2008). En la leche materna, la concentración de este tipo de lípidos fluctúa entre 0.1 y 1.4% del total de ácidos grasos, en relación al consumo de alimentos de origen marino (Brenna et al., 2007).

En general, la dieta de la madre ejerce una influencia sobre la composición de la leche y, por lo tanto, repercute en la salud del infante, tanto en su desarrollo físico como mental (Innis, 2007; Koletzko et al., 2001). La composición de lípidos en leche está representada principalmente por triglicéridos, fosfolípidos, esteroides e incluso vitaminas solubles en grasa, y la composición de los triglicéridos depende de la dieta materna

(Lammi-Keefe y Jensen, 1984). Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) que se incluyen en la dieta del recién nacido contribuyen al desarrollo neurológico (Hoffman et al., 2000; Neuringer, 2000). Los infantes alimentados de leche materna obtienen mejores resultados en las pruebas de evaluación neurológica, lo cual se ha atribuido al contenido de DHA presente en leche materna (Agostoni et al., 1995; San Giovanni et al., 2000). Después del nacimiento, el contenido de ácidos grasos del infante depende de su capacidad de síntesis a partir de precursores (Salem et al., 1996) y del aporte de LC-PUFA preformados en la leche materna (Gibson et al., 1997; Henderson et al., 1992). A su vez, el contenido de LC-PUFA en la leche se ha correlacionado directamente con el consumo materno de estos ácidos grasos (Harris et al., 1984; Jensen et al., 1992). Los LC-PUFA secretados en la leche provienen de la absorción intestinal de lípidos en la dieta, de la movilización de reservas maternas y de la síntesis endógena por el hígado (Gibson et al., 1997; Jensen et al., 2000; Makrides et al., 1996). En madres chilenas se encontró una relación entre un bajo consumo de alimentos marinos, principal fuente de ácidos grasos ω -3, y un bajo contenido de DHA en la leche; los resultados demostraron que la ingesta de DHA del grupo suplementado aumentó de 64 mg día^{-1} a $335.9 \text{ mg día}^{-1}$. El valor basal de DHA en la leche fue de $0.15 \pm 0.05\%$ del total de ácidos grasos, y aumentó a $0.22 \pm 0.10\%$, al suplementar a las madres con 320 g de jurel por semana (Gaete et al., 2002).

Los lípidos procedentes de peces son distintos de los lípidos procedentes de mamíferos; porque están conformados por ácidos grasos de cadena larga (14-22 átomos de carbono) con un alto grado de insaturación (Tabla II), mientras que los ácidos grasos de los mamíferos, en general, no contienen más de dos dobles enlaces por molécula (Stansby y Hall, 1967). En los peces de agua dulce aproximadamente 70% de los PUFA contienen cuatro, cinco o seis dobles enlaces; mientras que en los peces de agua de mar esta proporción es alrededor de 88% (Stansby y Hall, 1967). Algunos ácidos grasos, como el linoléico y linolénico, se consideran esenciales en la nutrición humana debido a que no son sintetizados por el organismo (Gibson y Kneebone, 1981). En los peces, estos ácidos grasos representan cerca del 2% del total de lípidos, lo cual representa un porcentaje menor en comparación con los aceites vegetales (Sanders y Reddy, 1992). No obstante, los aceites de

pescado contienen otros PUFA, como el ácido eicosapentaenóico que tiene propiedades antitrombóticas (Simopoulos et al., 1991).

Tabla II. Ácidos grasos ω -3, en 18 especies de pescados mexicanos de amplio consumo en México ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de filete).

Pescado	n	ALA	11,14,17 eicosatrienioco	EPA	DHA
Abadejo	15	1.13 (0.43)	nd	8.30 (3.6)	105.52 (31.26)
Angelito	18	4.18 (1.78)	nd	12.23 (2.67)	123.74 (23.64)
Atún aleta amarilla	25	2.15 (0.48)	25.08 (3.14)	15.48 (0.53)	152.40 (2.65)
Bandera	18	3.66 (0.70)	nd	3.82 (0.31)	35.67 (0.67)
Bobo escama	15	3.09 (0.79)	nd	0.56 (0.17)	1.39 (0.36)
Conejo	24	0.58 (0.05)	nd	15.66 (4.52)	28.75 (1.26)
Gurrubata	15	2.59 (0.55)	0.29 (0.07)	7.91 (2.14)	79.97 (6.82)
Lebrancha	15	7.24 (0.39)	nd	77.92 (6.08)	84.82 (5.44)
Lengua	32	1.43 (0.03)	nd	9.16 (1.41)	31.03 (6.27)
Lenguado	22	nd	nd	3.17 (0.63)	78.45 (11.27)
Merluza	18	1.78 (0.22)	nd	22.54 (6.04)	102.08 (13.77)
Pargo huachinango	25	1.01 (0.43)	0.32 (0.02)	28.07 (5.45)	237.33 (1.83)
Picuda	19	2.56 (0.63)	nd	55.54 (0.75)	35.79 (7.36)
Pierna	18	1.37 (0.67)	nd	4.30 (1.82)	92.23 (7.89)
Rubia	16	1.99 (0.46)	nd	1.49 (0.07)	237.88 (3.05)
Sargo	18	nd	nd	55.67 (1.04)	85.00 (2.67)
Tiburón	22	1.90 (0.28)	nd	7.93 (0.45)	23.82 (6.57)
Verdillo	15	0.64 (0.16)	nd	12.25 (3.81)	84.82 (5.44)

nd = no detectado n = N° de repeticiones

ALA = ácido α -linolénico, EPA = ácido eicosapentaenoico, DHA = ácido docosahexaenoico. Tomado de Castro-González et al. (2007).

Aunque la desnutrición no tiene efectos significativos sobre la concentración de proteínas en leche humana (Cowars, 1984), en mujeres suecas con un estado nutricional estable, la concentración de proteínas en leche fue menor en mujeres con una dieta baja en proteína (8% del total de energía) en comparación con mujeres que se alimentaron de una dieta alta en proteínas (14% del total de energía) (Lindblad, 1974).

En la lactancia se liberan, además de PUFA esenciales, reservas corporales de la madre para satisfacer las demandas energéticas del infante (Sauerwald et al., 2001). El contenido de antioxidantes, tanto compuestos de bajo peso molecular como vitaminas, proteínas y enzimas, en leche materna contribuye a evitar procesos de oxidación de lípidos

y proteínas, y sirve como mecanismo de defensa adicional para el infante (Picciano, 1998; Lindmark-Månsson y Åkesson, 2000).

La capacidad antioxidante, definida como la capacidad de neutralizar la reactividad y/o inhibir la generación de radicales libres (Thornalley y Vasak, 1985; Greenwald, 1990), de la leche humana es mayor en comparación con la leche de fórmula (Hanna et al., 2004). La concentración de antioxidantes en la leche también depende de la dieta, el lugar de residencia, medicamentos, así como el estilo de vida de la madre (Sadeghi et al., 2009).

Los antioxidantes exógenos, es decir provenientes de la dieta, incluyen a la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides (Halliwell y Gutteridge, 2007; Konisberg, 2008). Algunos de los principales antioxidantes endógenos (producidos por el organismo) son las enzimas superóxido dismutasa (SOD), glutatión peroxidasa (GPx), glutatión reductasa (GR), glutatión S-transferasa (GST) y catalasa; además, existen antioxidantes endógenos no enzimáticos, como el glutatión (GSH), ácido úrico, entre otros (Eberhardt, 2001; Halliwell y Gutteridge, 2007; Konisberg, 2008).

Superóxido dismutasa (SOD) (E.C.1.15.1.1)

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del anión peróxido de hidrógeno (H_2O_2) (Fig. 1). Existen tres tipos de SOD que se diferencian de acuerdo al metal unido a la enzima, manganeso, cobre y zinc, o hierro (Konisberg, 2008). En leche materna se ha identificado principalmente actividad de la Mn-SOD.

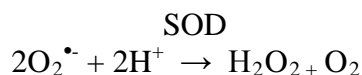


Figura 1. Reacción antioxidante catalizada por superóxido dismutasa (SOD). $\text{O}_2^{\bullet-}$ = ion superóxido H^+ =ion hidrógeno, H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, O_2 =oxígeno. (Tomado de Lindmark-Månsson y Åkesson, 2000).

Catalasa (E.C.1.11.1.6)

La catalasa (CAT) cataliza la descomposición del H_2O_2 (Fig. 2).

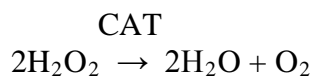


Figura 2. Reacción catalizada por la enzima catalasa (CAT). H_2O_2 = peróxido de hidrógeno, O_2 = oxígeno. Tomado de Lindmark- Månsson y Åkesson (2000).

La CAT tiene la capacidad metabolizar el H_2O_2 a H_2O y O_2 (Gutteridge y Halliwell 1999). La CAT también se encuentra dentro de los leucocitos; esto explica su resistencia frente a la desnaturalización por el calor y su posterior liberación causando una aparente reactivación (Lindmark- Månsson y Åkesson, 2000).

La enzima catalasa tiene un papel predominante en el control de la concentración de H_2O_2 (Gaetani et al, 1996), su estructura rígida y estable provee mayor resistencia al pH, desnaturalización térmica y proteólisis en comparación con otras enzimas (Goyal, 2010).

Glutación peroxidasa (E.C.1.11.1.9)

La glutación peroxidasa (GPx) elimina al H_2O_2 y otros peróxidos a una velocidad alta (Fig. 3). Su grupo funcional unido a selenio (Se) es oxidado por el H_2O_2 y después se reduce por el GSH, que se convierte en el glutación oxidado (GSSG) (Gutteridge y Halliwell, 1999). El Se se incorpora a las proteínas como seleno-cisteína o como seleno-metionina (Hawkes et al., 1985; Sathe et al., 1992).

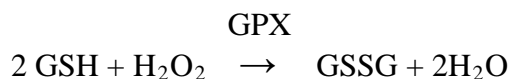


Figura 3. Reacción catalizada por la enzima antioxidante glutación peroxidasa (GPx). GSH= glutación reducido, GSSG = glutación oxidado, H_2O_2 =peróxido de hidrógeno, H_2O = agua. Tomado de Lindmark- Månsson y Åkesson (2000).

Glutación (GSH)

El GSH es un tripéptido de bajo peso molecular, es un tiol no proteínico y se encuentra en altas concentraciones en todas las células (Konisberg, 2008). Funciona como donador de equivalentes reductores que contribuye en la reacción de la GPx para reducir el

H₂O₂ a H₂O (Fig. 4) De esta manera, el GSH se transforma en GSSG (Halliwell y Gutteridge, 2007).

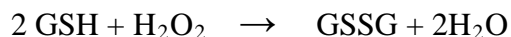


Figura 4. Mecanismo de acción del antioxidante glutatión. GSH = glutatión reducido, GSSG = glutatión oxidado, H₂O₂ = peróxido de hidrógeno, H₂O = agua. Tomado de Lindmark-Månsson y Åkesson (2000).

El GSSG se reduce por acción de la enzima glutatión reductasa (GR) con ayuda del dinucleótido de nicotinamíina adenína fosfato reducido (NADPH) en un ciclo redox (Halliwell y Gutteridge, 2007). En la mitocondria, el GSH regula las vías de muerte celular y progresión de enfermedades y también funciona como cofactor de otras enzimas antioxidantes (glutarredoxinas y tiorredoxinas) (Konisberg, 2008).

Glutatión S-transferasa (GST)

Esta enzima se encuentra relacionada frecuentemente con el metabolismo de xenobióticos, los cuales son metabolizados mediante una reacción de conjugación con el GSH, dicha reacción es catalizada por la GST.

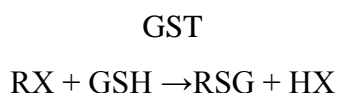


Figura 5. Reacción detoxificante catalizada por la enzima GST. RX= xenobiótico, GSH= glutatión reducido, RSG = xenobiótico conjugado, HX = haluro de hidrógeno. Tomado de Halliwell y Gutteridge (2007).

Factores antioxidantes en leche

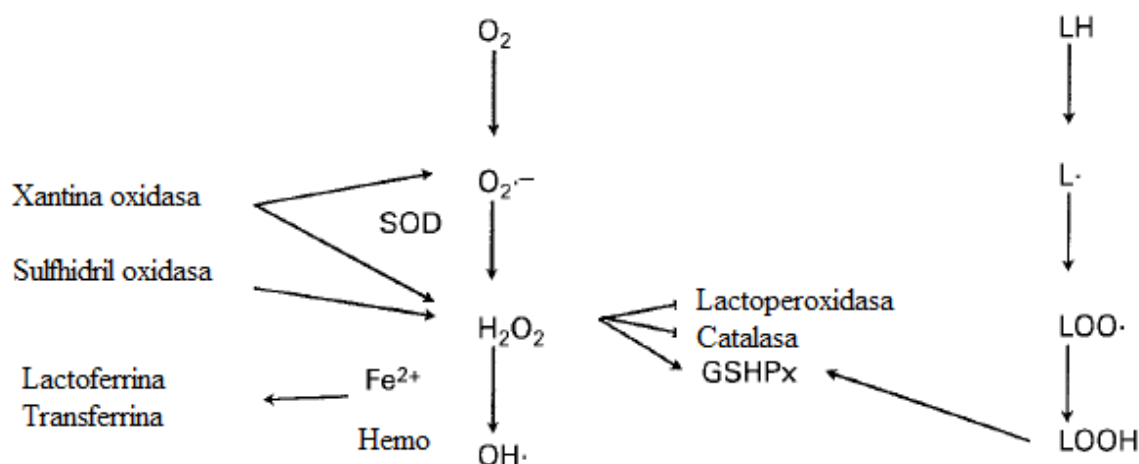


Figura 6. Acción propuesta de algunas moléculas prooxidantes y antioxidantes en leche. La secuencia de reacciones de la izquierda incluye oxígeno (O_2), anión superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (OH^{\bullet}). La secuencia de la derecha incluye ácido graso insaturado (LH), radical lipídico (L^{\bullet}), radical peróxilo (LOO^{\bullet}) e hidroperóxido de ácido graso (LOOH). Fe^{2+} = ion fierro (II), SOD = superóxido dismutasa, GSHPx = glutatión peroxidasa. Tomado de Lindmark-Månsson y Åkesson (2000).

La oxidación de moléculas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos puede originar un estado de estrés oxidativo; es decir, un desbalance entre la acción de los agentes pro-oxidantes y la respuesta antioxidante, donde la balanza se inclina a favor de los primeros, generando daño molecular y celular (Sies, 1997; Murray, 1997). Los agentes oxidantes pueden ser exógenos (fármacos) o endógenos (especies reactivas de oxígeno) (Abramson et al., 2005). Especies reactivas de oxígeno (ERO) es el término que se aplica tanto a radicales libres como a moléculas reactivas que, sin ser radicales libres, son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos a radicales libres. En mamíferos, las ERO intervienen en procesos fisiopatológicos; por ejemplo, como mecanismo de defensa contra microorganismos (Gutteridge y Halliwell, 1999).

La oxidación de proteínas se distingue por la generación de grupos carbonilo, los cuales se originan a través de diversas reacciones químicas, las cuales se pueden dividir en

cuatro rutas principales. La primera consiste en una oxidación directa de algunos aminoácidos (prolina, lisina, arginina y treonina) por reacción con ERO; originando semialdehídos como el glutámico y aminoadípico, los cuales son productos carbonilados y representan la mayor parte de una medición de carbonilación (Requena et al., 2003). La segunda ruta de formación de grupos carbonilo consiste en la ruptura de la cadena polipeptídica gracias a una reacción de α -amidación o por oxidación de residuos de ácido glutámico, lo que genera la formación de péptidos donde el aminoácido N-terminal está bloqueado por un derivado α -cetoacilo. Las dos rutas restantes consisten en reacciones secundarias con moléculas que presentan grupos carbonilos reactivos, los cuales se han formado previamente por reacción directa de las proteínas con ERO. La oxidación proteica generalmente es irreversible, la única manera de reparar la oxidación es mediante la proteólisis de los sustratos oxidados y la síntesis *de novo* de dichas proteínas (Dalle-Donne et al., 2003). La oxidación de proteínas se ha correlacionado positivamente con el incremento en la edad y en ciertas patologías (Díaz-Acosta y Membrillo-Hernández, 2006).

La oxidación lipídica afecta especialmente a los ácidos grasos poliinsaturados y puede ser originada por O_2 , $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y OH^{\cdot} (Jerlick et al., 2000; Cadenas, 1997; Reylli y Burkley, 1990). Una vez que se inicia, se desencadena una cascada de reacciones químicas con la subsecuente producción de radicales libres que provoca la formación de peróxidos orgánicos y otros productos a partir de los ácidos grasos insaturados (Rangon y Burkley, 1993). Algunos factores que intervienen en el grado de peroxidación lipídica son la naturaleza del agente inicializador, el grado de insaturación, la presencia de Fe, el contenido de antioxidantes y la activación de enzimas que pueden terminar con la reacción en cadena de la peroxidación.

Existen diversos mecanismos homeostáticos que ayudan al organismo a evitar o reparar el daño oxidativo que causan las ERO (Kinsella et al., 1993). Debido a que los antioxidantes presentes en la dieta pueden modificar los niveles de estrés oxidativo, tanto en humanos como en modelos animales, se sugiere que el consumo de alimentos ricos en antioxidantes puede contribuir a una vida más saludable y aunque la respuesta antioxidante endógena aparentemente está controlada genéticamente, también puede ser afectada por factores epigenéticos (Céspedes et al., 2000). Sin embargo, la mayoría de los estudios

publicados se han limitado a la evaluación de la ingesta durante el período de estudio o a la relación entre las dietas enriquecidas con antioxidantes específicos y ciertos marcadores del estrés oxidativo (Sohal et al., 1990).

En el presente trabajo se evaluaron las diferencias en el metabolismo oxidativo entre diferentes grupos de mujeres lactantes, tomando en cuenta diversos factores, como el número de gestas, la edad y la alimentación.

2. ANTECEDENTES

La ingesta de leche materna es importante para el infante debido a que ésta es una fuente rica en nutrientes y contiene moléculas biológicamente activas con funciones antioxidantes específicas (Buescher et al., 1989). Además, la leche materna contiene moléculas esenciales que deben ser protegidas para el aprovechamiento por parte del infante; una dieta rica en PUFA, sin la protección de antioxidantes, puede ser un importante contribuyente a la carga de ERO (Andrews et al., 2006), debido a la formación de radicales peroxilo, que son catalizadores de reacciones de oxidación adicionales (Brzezinska-Slebozinska et al., 1994).

Los niños alimentados con leche materna poseen una barrera antioxidante (incluyendo albúminas, bilirrubina, cisteína, ácido úrico, glutatión, coenzima Q10, lactoferrina) más eficaz en sangre y, en general, un menor nivel de estrés oxidativo en comparación con los niños alimentados con leche de fórmula (Shoji et al., 2004; Zoeren-Grobben et al., 1994; Aycicek et al., 2006; Buescher y McIlhean, 1992). La leche materna contiene un gran número de antioxidantes, incluyendo las vitaminas A, C y E, y enzimas antioxidantes, tales como CAT, SOD y GPx (Friel, 2002).

La actividad de CAT, SOD y GPx en leche es similar a aquella en el suero de la madre (L'Abbe y Friel, 2000). Jannat et al. (2008) encontraron que la actividad de las enzimas antioxidantes, tales como la SOD y GPx, aumenta a lo largo del periodo de lactancia. Por el contrario, otros estudios sobre la actividad enzimática encontraron que disminuyen con el tiempo de lactancia tanto la actividad de la GPx como la concentración de Se (Hojo, 1986). La actividad de la GPx en la leche humana está en el mismo rango que

en la leche bovina, 31 ± 39 U mL⁻¹, y también se correlaciona positivamente con la concentración de Se (Hojo, 1986). La actividad de SOD en leche humana fue en promedio 4.8 U mg⁻¹ de proteína y la de GPx fue 9.8 mU mg⁻¹ de proteína durante doce semanas de lactancia (L'Abbe y Friel, 2000). Esta actividad fue mayor en comparación con aquella en plasma humano (de 0.2 a 0.4 mU mg⁻¹ de proteína) en un grupo de mujeres de 24 a 44 años (L'Abbe, 2000). Hübner-Woźniak et al. (2000) no encontraron diferencias en la actividad de SOD en sangre, en relación con la edad de las mujeres; por el contrario, encontró un incremento en la actividad de CAT y GPx relacionado con el aumento en la edad. En estudios realizados por Bogdan et al. (1986) se registró una actividad de GPx de 36 mU mg⁻¹ de proteína en leche humana, lo cual fue mayor en comparación con otras especies, representando el 25% de la actividad realizada por el total de enzimas peroxidadasas, para ese grupo. Turoli et al. (2004) reportaron que las concentraciones de antioxidantes no enzimáticos en la leche también varían de acuerdo con el período de lactancia; las mayores concentraciones de GSH se registraron en el periodo de calostro (Turoli et al., 2004).

3. JUSTIFICACIÓN

La leche materna contiene un gran número de moléculas funcionales que ayudan a preservar la salud del infante, e incluso influyen en su salud en la edad adulta. Dichas moléculas pueden verse afectadas por diversos factores; por lo tanto, es importante conocer los mecanismos que afectan la calidad de la leche, entre ellos el balance entre moléculas prooxidantes y antioxidantes. Lo anterior permitirá dar la importancia apropiada a la lactancia, sobre todo en los primeros meses de vida.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar los indicadores del metabolismo oxidativo presente en la leche materna y correlacionar los resultados con algunas variables antropométricas y con el tipo de alimentación de las madres lactantes.

4.2 Objetivos particulares

Determinar la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y GST) y las concentraciones de antioxidantes no enzimáticos (GSH) presentes en las muestras de leche materna.

Determinar los niveles de TBARS y carbonilos proteicos como indicadores de daño oxidativo en las muestras de leche materna.

Relacionar la actividad de enzimas antioxidantes y de daño oxidativo con el tipo de alimentación, el número de embarazos y la edad de las madres.

5. HIPÓTESIS

Existen diversos factores que afectan la composición y función de la leche materna. Por lo tanto, se espera encontrar una relación entre el daño oxidativo y las defensas antioxidantes presentes en la leche y el tipo de alimentación, el número de gestas y la edad de las madres.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Área y grupos de estudio

Las muestras de leche materna se obtuvieron de 45 mujeres voluntarias en periodo de puerperio (7-10 días postparto). Se estudiaron tres grupos de mujeres (n=15) según el número (1, 2 y ≥ 3) de gestas, provenientes de instituciones de salud, públicas y privadas, en la ciudad de La Paz, todas ellas sudcalifornianas de nacimiento y con residencia durante toda su vida en Baja California Sur.

6.2 Toma de muestras

Las muestras de leche (aproximadamente 35 mL) se tomaron en el domicilio de las voluntarias. Las muestras se almacenaron en congelación (-20°C) hasta su análisis. En el momento de la toma de muestras, se aplicó un cuestionario para recabar información sobre las principales variables antropométricas de las madres y su alimentación, entre otros (Anexo 1).

6.3 Análisis de laboratorio

Preparación del homogenizado

Previo al análisis de los indicadores de estrés oxidativo, se homogenizó cada muestra (500 µL) de leche entera. Se centrifugaron las muestras a $905.6 \times g$ por 10 minutos a 4°C en una centrífuga Sorvall® (RT, Massachusetts, E.U.A), se recuperó el sobrenadante y se le agregó fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF, 1 mM) como inhibidor de proteasas.

6.3.1 Actividad enzimática

6.3.1.1 Superóxido dismutasa (E.C.1.15.1.1)

La actividad de la SOD se determinó como la inhibición de la reducción de nitroazul de tetrazolio (NBT) a formazán (Hermes-Lima y Storey, 1995). El formazán es un producto color rosa que puede ser detectado por espectrofotometría a 560 nm. Para determinar la actividad de la SOD se utilizó el sistema xantina/xantina oxidasa como generador constante de ($O_2^{\bullet-}$) y la consecuente reducción del NBT a formazán. Las muestras homogenizadas se diluyeron con solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M). En una celda de plástico se colocaron y mezclaron solución amortiguadora sodio-carbonato (50 mM), xantina (0.1 mM), NBT (0.025 mM), EDTA (0.1 mM), xantina oxidasa (1 U mL⁻¹ en sulfato de amonio 2 M) y las muestras o blancos (solución para homogenizar, pH 7.5). Todos los reactivos se mantuvieron a 25°C. Se registró el cambio en la absorbancia cada 30 segundos durante 5 minutos en el espectrofotómetro (Beckman Coulter Du 800, Fullerton, CA). Los resultados se expresaron en unidades (U) SOD por miligramo de

proteína soluble. Una unidad de actividad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para inhibir el 50 % de la máxima reacción del $O_2^{\bullet-}$ con el NBT.

6.3.1.2 Catalasa (E.C.1.11.1.6)

La CAT tiene como sustrato al H_2O_2 . Para cuantificar la actividad de CAT se registra por espectrofotometría la desaparición del H_2O_2 a 240 nm (Aebi, 1984). A una celda de cuarzo se le agregó solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M), solución de H_2O_2 (20 mM) y la muestra homogenizada. El cambio en la absorbancia se midió a 240 nm cada 15 segundos durante 2 minutos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis). La actividad enzimática se expresó en U de CAT por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad de CAT se define como la cantidad de enzima que cataliza la descomposición de 1 mol H_2O_2 por minuto.

6.3.1.3 Glutación peroxidasa (E.C.1.11.1.9)

La actividad de GPx se determina usando H_2O_2 como sustrato de la enzima dependiente de Se, y se mide el decremento de la concentración de NADPH en un ensayo acoplado con GR que cataliza la oxidación de NADPH a 240 nm (Hermes-Lima y Storey, 1998; Folh  y G nzler, 1984). En una celda se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH7.2), EDTA (50 mM), azida de sodio (20 mM), GR (15 U mL⁻¹), NADPH (1.5 mM), GSH (250 mM), homogenizado y agua desionizada, y se leyó la absorbancia a 340 nm por 40 segundos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis). Este resultado fue tomado como primer blanco. Inmediatamente después de la lectura se le agregó H_2O_2 (10 mM) a la celda leída previamente, para continuar con otra lectura por 40 segundos. Este segundo resultado fue tomado como la absorbancia de la muestra. En otra celda de plástico se agregaron las soluciones anteriores, con excepción de la muestra, y se leyó en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis) a 340 nm por 40 segundos; el resultado fue tomado como segundo blanco. Se realizaron los cálculos utilizando el coeficiente de extinción de NADPH (6.22 mL⁻¹) y se expresaron los resultados en U de actividad de GPx por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad de GPx se define como la cantidad de enzima que oxida 1 μ mol NADPH por minuto.

6.3.1.4 Glutación S-transferasa. (E.C.2.5.1.18)

La actividad de GST se midió mediante la aparición del complejo tioeter glutatión dinitrobenzeno a partir de la conjugación de GSH y 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) (Habig y Jakoby, 1981). En una celda de plástico se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (0.1 M), GSH (10 mM), EDTA (60 mM), CDNB (10 mM) y la muestra. Se registró el cambio de absorbancia cada 30 segundos durante 6 minutos a 340 nm en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis). La actividad enzimática se expresó en U de GST por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad de GST es la cantidad de enzima de que produce 1 mol GSH-conjugado por minuto.

6.3.1.5 Glutación reductasa. (E.C. 1.6.4.2)

La GR es una enzima dependiente de NADPH que cataliza la reducción del GSSG a GSH, el cual será utilizado por GPx para la posterior reducción del H₂O₂ y de los lipoperóxidos (L-OOH) (Halliwell y Gutteridge, 2007). Se determinó la actividad de GR midiendo la disminución en la absorbancia observada durante la oxidación de NADPH a NADP⁺ por GSSG (Hermes- Lima y Storey, 1998, Goldberg y Spooner, 1983). En una celda se mezclaron solución amortiguadora de fosfatos (500 mM, pH7.2), EDTA (50 mM), NADPH (2 mM), homogenizado y agua desionizada, se leyó a 340 nm por 40 segundos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis) (primer blanco). Inmediatamente después de la lectura se le agregó GSSG (10 mM) a la celda, para continuar con otra lectura por 40 segundos (absorbancia de la muestra). En otra celda de plástico se agregaron todas las soluciones anteriores, con excepción de la muestra, y se leyó a 340 nm por 40 segundos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis) (segundo blanco). Los resultados se expresaron en U de GR por miligramo de proteína soluble. Una unidad de actividad de GR se define como la cantidad de enzima que reduce 1 μmol GSSG por minuto.

6.3.2 Glutación

Para cuantificar la concentración de GSH se utilizó el método de Griffith (1980) con las modificaciones descritas por Hermes-Lima y Storey (1995). Este método se basa en la reacción de GSH con ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (DTNB) que da como producto

una coloración amarilla que puede detectarse por espectrofotometría a 412 nm. Se homogenizaron las muestras diluyendo 50 μL de leche entera en ácido sulfosalicílico (5%). Posteriormente, las muestras fueron burbujeadas con nitrógeno (N_2) por 10 segundos, se centrifugaron por 5 minutos a $17004.8 \times g$ a 4°C . Se recuperó el sobrenadante y se colocó en tubos Eppendorf® que fueron colocados en hielo. Para determinar la concentración de GSH total (GSH-Eq) se agregó a una celda de plástico la muestra, NADPH (0.3 mM), DTNB (6 mM), GR (50 U mL^{-1}), se registró la absorbancia a 412 nm durante 130 segundos en un espectrofotómetro (Beckman 6505 UV/Vis). La concentración de GSH-Eq se calculó a partir de una curva estándar utilizando GSH en lugar de muestra. Los resultados se expresan en nanomoles de GSH por miligramo de proteína.

6.3.3 Daño oxidativo

6.3.3.1 Daño oxidativo a lípidos

Se midieron los niveles de peroxidación de lípidos como el contenido de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) mediante la cuantificación de la concentración de malondialdehído (MDA). El MDA es un pigmento rosa cristalino que se forma cuando los hidroperóxidos y aldehídos lipídicos, producto de la lipoperoxidación, reaccionan con el ácido tiobarbitúrico (TBA) y se registra la absorbancia a 532 nm (Ohkawa et al., 1979; Persky et al., 2000). Para la cuantificación de TBARS, se preparó una curva estándar con 1,1,3,3- tetraetoxipropano (TEP) en un rango de 0 a 5 nmoles $250 \mu\text{L}^{-1}$. Los tubos con la curva estándar y el homogenizado se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Para detener la reacción todos los tubos se colocaron en baño de hielo e inmediatamente se les agregó ácido tricloroacético (TCA, 12.5%). Posteriormente, se añadió ácido tiobarbitúrico (TBA, 1%) y se incubó a 90°C con agitación durante 10 minutos. Finalmente, los tubos se enfriaron en baño de hielo y fueron centrifugados a $905.6 \times g$ por 10 minutos a 4°C . Una vez recuperado el sobrenadante, se leyó la absorbancia a 532 nm. Los niveles de TBARS en las muestras de leche se obtuvieron a partir de la curva estándar. Los resultados se expresaron en nmoles de TBARS por miligramo de proteínas solubles.

6.3.3.2 Daño oxidativo a proteínas

El daño oxidativo a proteínas puede ser el resultado de las reacciones de interacción entre aldehídos procedentes de la peroxidación de proteínas, produciendo derivados carbonilos (Konisberg, 2008). Se cuantificó el daño a proteínas por el contenido de carbonilos proteicos (Levine et al., 1994; Vázquez-Medina et al., 2007), midiendo la formación de un complejo entre los derivados carbonilados de las proteínas y la 2,4 – dinitrofenil hidracina (DNPH). Se tomaron 500 μ L de leche entera, homogenizándola con ácido sulfosalicílico (5%). El líquido homogenizado se separó en 4 tubos (2 blancos y 2 muestras), los cuales se centrifugaron a 22639.5 \times g por 5 minutos a 4°C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se agregó DNPH (10 mM) a las muestras y HCl (2 M) a los blancos y se dejaron incubar por una hora. Al término de este tiempo, se añadió ácido tricloroacético (TCA, 20%), se centrifugó a 22639.5 \times g por 5 minutos a 4°C, se eliminaron los sobrenadantes, y se realizaron 3 lavados con etanol-acetato de etilo (1:1) centrifugando después de cada lavado a 22639.5 \times g por 5 minutos a 4°C. Al término de la última centrifugación se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con clorato de guanidina (6 M), para desnaturalizar las proteínas. Se incubaron los tubos por 15 minutos a 37°C y nuevamente fueron centrifugados a 22639.5 \times g por 5 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes en celdas de plástico para ser leídas en el espectrofotómetro con barrido en el rango de 340-410 nm, se registró la absorbancia máxima para determinar la concentración de carbonilos proteicos con ayuda del coeficiente de extinción de 22 mMol L⁻¹. Los resultados se expresaron en μ moles de carbonilos proteicos por miligramo de proteína total.

6.3.4 Proteínas solubles

Se calculó la concentración de proteínas solubles presentes en la leche para estandarizar los resultados, tanto de la actividad de las enzimas antioxidantes como del daño oxidativo. Se utilizó el kit comercial de Bio-Rad© (Laboratories Hercules, CA), de acuerdo al método establecido por Bradford (1976) adaptado a microplaca y con albúmina bovina sérica como estándar. El método se basa en el cambio de absorbancia de una solución ácida de azul de Coomassie (G250, contenida en el reactivo de Bradford). El complejo que se forma entre las proteínas y el colorante se determinó a 620 nm en un lector

de microplacas (Multiscan FC, MRX Revelation, Chantilly, VA, EUA). La concentración de proteínas en las muestras de leche se calculó a partir de la curva estándar. Los datos se expresan en miligramos de proteína por mililitro.

6.4 Análisis Estadísticos

Los resultados se agruparon de acuerdo al número de gestas y a la frecuencia de consumo de alimentos marinos. Se realizaron pruebas básicas de estadística descriptiva, así como pruebas para medir el ajuste de la distribución de las muestras a la curva normal, usando pruebas de probabilidad Kolmogorov-Smirnov (Álvarez-Cáceres, 1995; Zar, 1996). Los resultados de la distribución de las variables fueron en su mayoría no normales. Por lo tanto, se utilizó estadística no paramétrica para buscar diferencias entre grupos, mediante el análisis de varianza de Kruskal – Wallis (K-W) (Vargas- Sabadías, 1995). Para todos los casos se consideró 95% como nivel de confianza. También se utilizó la r de Spearman para evaluar la correlación y se hizo un análisis multivariado para explicar la interacción entre variables (Álvarez-Cáceres, 1995). El nivel de probabilidad de 5% se tomó como estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante el uso de los paquetes estadísticos SYSTAT 12.0 (SPSS) y STATISTICA 8. Los datos fueron reportados como media \pm error estándar.

7. RESULTADOS

Los resultados del cuestionario aplicado a las madres lactantes se resumen en la Tabla II. El grupo incluye mujeres jóvenes de 16 a 41 años, con un índice de masa corporal promedio de 29.8 ± 0.71 .

Tabla III. Variables antropométricas de mujeres lactantes y tipo de alimentación, agrupados según el número de gestas.

	Grupo 1 <i>n=15</i>	Grupo 2 <i>n=15</i>	Grupo 3 <i>n=15</i>
Edad (promedio \pm error estándar)	23.2 \pm 1	26.9 \pm 1.4	28.0 \pm 1.4
IMC (promedio \pm error estándar)	30.2 \pm 1	28.6 \pm 0.9	30.6 \pm 1.8
Consumo de pescado, frecuencia (%)			
Nunca o una vez al mes	3 (20)	8 (53)	9 (60)
Una vez cada dos semanas o varias veces por semana	12 (80)	7 (47)	6 (40)
Consumo de mariscos, frecuencia (%)			
Nunca o una vez al mes	9 (60)	12 (80)	13 (87)
Una vez cada dos semanas o varias veces por semana	6 (40)	3 (20)	2 (13)

El número de grupo corresponde con el número de gestas. IMC= Índice de masa corporal.

7.1 Enzimas antioxidantes

7.1.1 Superóxido dismutasa

En la figura 7 se presentan los resultados de la actividad de SOD en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre el grupo con una gesta (615.16 U mg^{-1} proteína) respecto al grupo con dos gestas (828.8 U mg^{-1} proteína) y al grupo con tres gestas (895.5 U mg^{-1} proteína) ($p=0.2$).

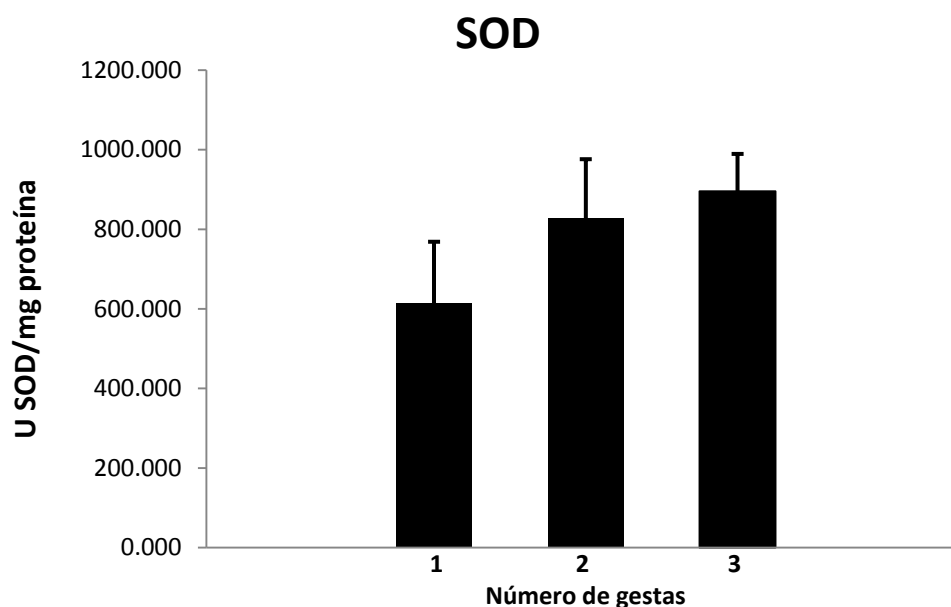


Figura 7. Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD, unidades miligramo⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

Sin embargo, a pesar de no encontrar diferencias entre grupos se observó un aumento del 45.6 % en la actividad de SOD entre el grupo de una gesta y el de tres o más gestas.

7.1.2 Catalasa

En la figura 8 se presentan los resultados de la actividad de CAT en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre el grupo con una gesta (28.8 U mg⁻¹ proteína), el grupo con dos gestas (28.9 U mg⁻¹ proteína) y el grupo con tres gestas (47.5 U mg⁻¹ proteína) ($p = 0.87$).

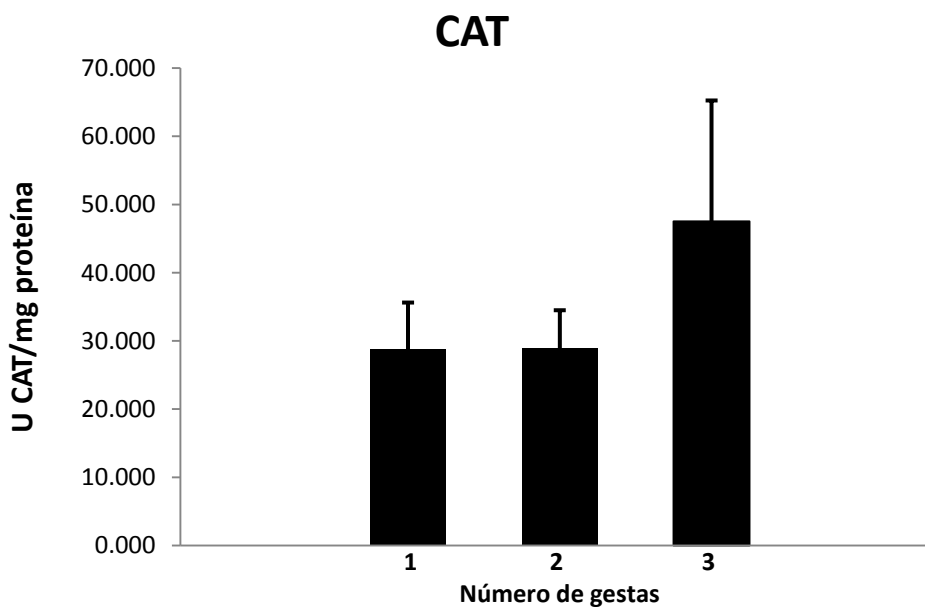


Figura 8. Actividad de la enzima catalasa (CAT, unidades miligramo⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

No obstante, pese a no encontrar diferencias entre grupos se pudo observar un aumento de aproximadamente 65% en la actividad de CAT entre el grupo de una gesta y el de tres o más gestas.

7.1.3 Glutación peroxidasa

En la figura 9 se presentan los resultados de la actividad de GPx en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre el grupo con una gesta (0.38 U mg^{-1} proteína), el grupo con dos gestas (0.87 U mg^{-1} proteína) y el grupo con tres gestas (1.16 U mg^{-1} proteína) ($p = 0.95$).

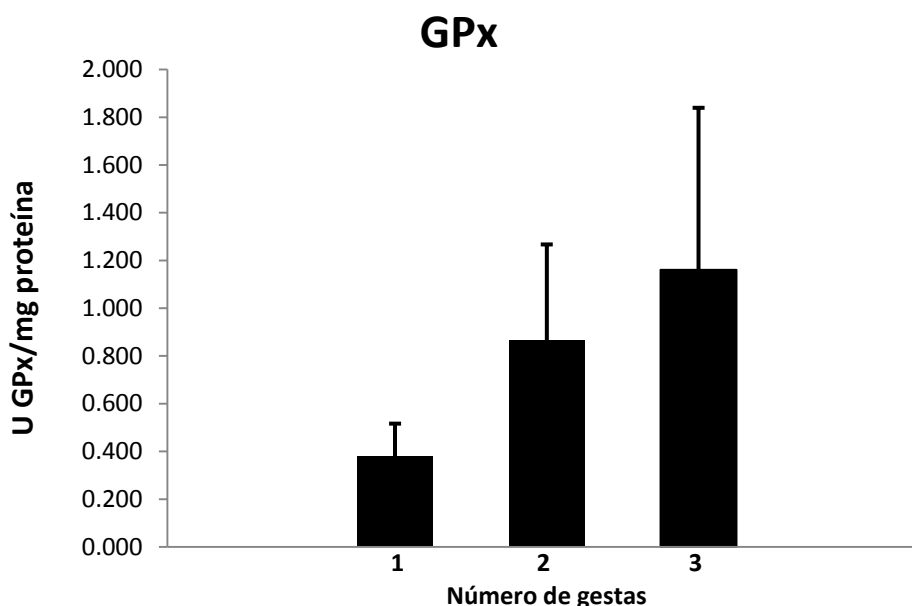


Figura 9. Actividad de la enzima glutatión peroxidasa (GPx, unidades miligramo⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

A pesar de no encontrar diferencias entre grupos en la gráfica 9 se puede observar un aumento en la actividad de la enzima GPx de aproximadamente 205% entre el primer y el tercer grupo.

7.1.4 Glutación S-transferasa

En la figura 10 se presentan los resultados de la actividad de GST en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre el grupo con una gesta (0.135 U mg^{-1} proteína), el grupo con dos gestas (0.125 U mg^{-1} proteína) y el grupo con tres gestas (0.293 U mg^{-1} proteína) ($p = 0.29$).

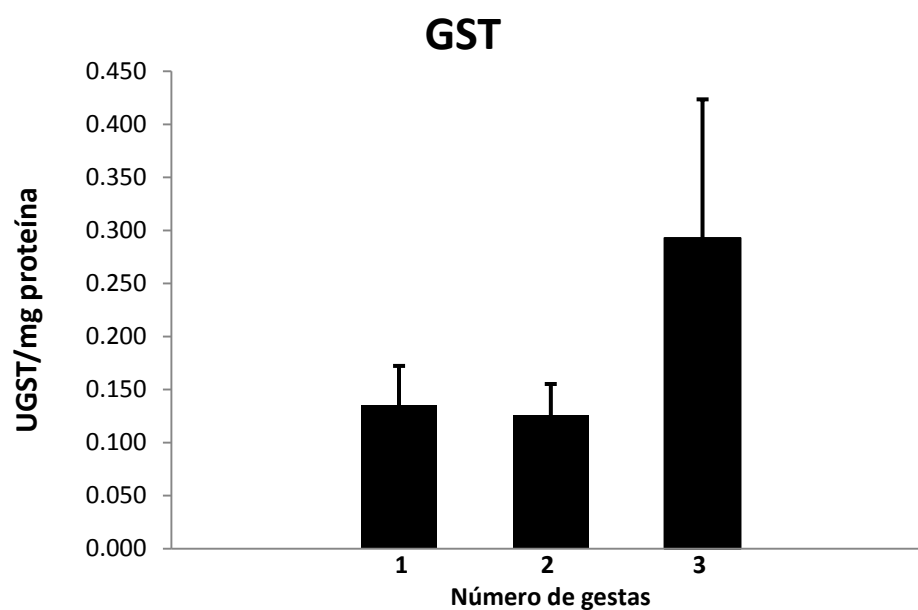


Figura 10. Actividad de la enzima glutatión S-transferasa (GST, unidades miligramo⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

Sin embargo, se puede observar en la figura 10 que existe un aumento en la actividad de GST entre el primer y el tercer grupo de aproximadamente 117%.

7.1.5 Glutación reductasa

En la figura 11 se presentan los resultados de la actividad de GR en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la actividad de esta enzima entre el grupo con una gesta ($0.48 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) respecto al grupo con dos gestas ($0.60 \text{ U mg}^{-1} \text{ prot.}$) y al grupo con tres gestas ($0.11 \text{ U mg}^{-1} \text{ proteína}$) ($p = 0.77$).

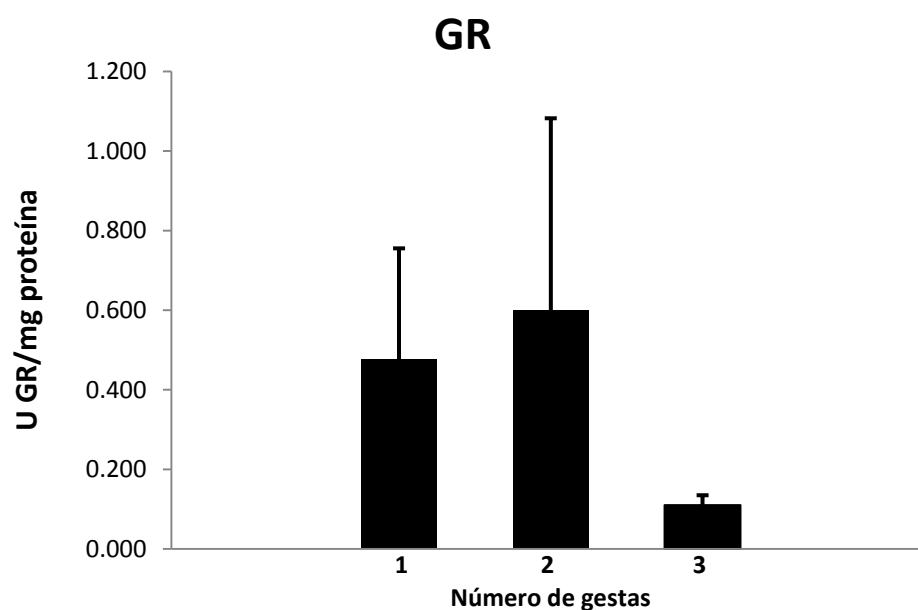


Figura 11. Actividad de la enzima glutatión reductasa (GR, unidades enzimáticas / miligramos de proteína soluble). Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar

Sin embargo, a pesar de que no se encontraron diferencias entre grupos, se puede observar en la figura 11 que existe una disminución en la actividad de GR, entre el primer y el tercer grupo, de aproximadamente 76.9%.

7.2 Glutación total

En la figura 12 se presentan los resultados de la concentración de GSH en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de este antioxidante entre el grupo con una gesta (41.9 nmol mg⁻¹ proteína) respecto al grupo con dos gestas (36.6 nmol mg⁻¹ proteína) y al grupo con tres gestas (34.3 nmol mg⁻¹ proteína) (p = 0.7).

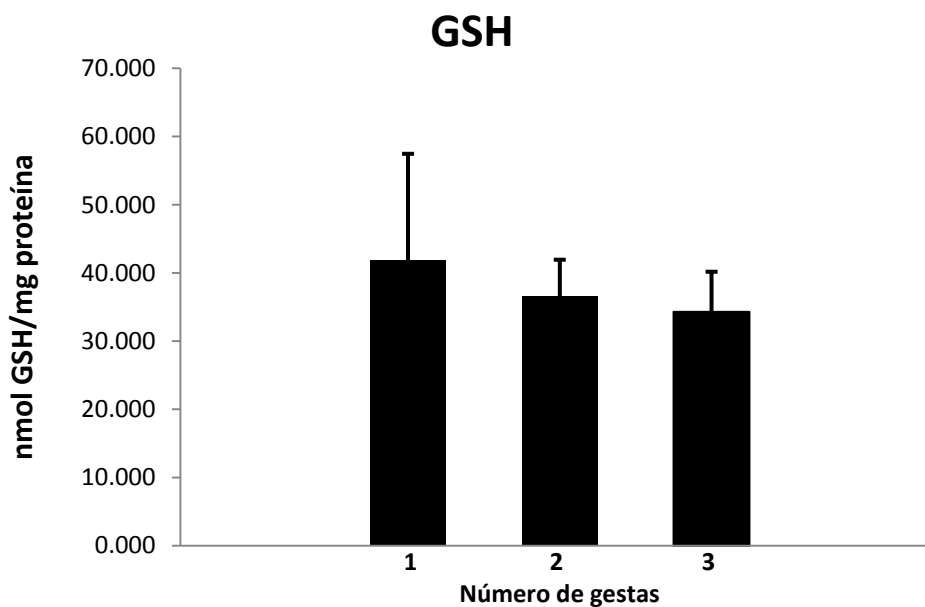


Figura 12. Concentración de glutatión (GSH, nanomoles miligramo⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

Se puede observar en la figura 12 que existe una disminución en la concentración de GSH, entre el primer y el tercer grupo, de 18%.

7.3 Daño oxidativo

7.3.1 Peroxidación de lípidos (TBARS)

En la figura 13 se presentan los resultados de la concentración de TBARS en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de TBARS entre el grupo con una gesta (356.23 nmol mg⁻¹ proteína) respecto al grupo con dos gestas (510.43 nmol mg⁻¹ proteína) y al grupo con tres gestas (482.68 nmol mg⁻¹ proteína) ($p = 0.23$).

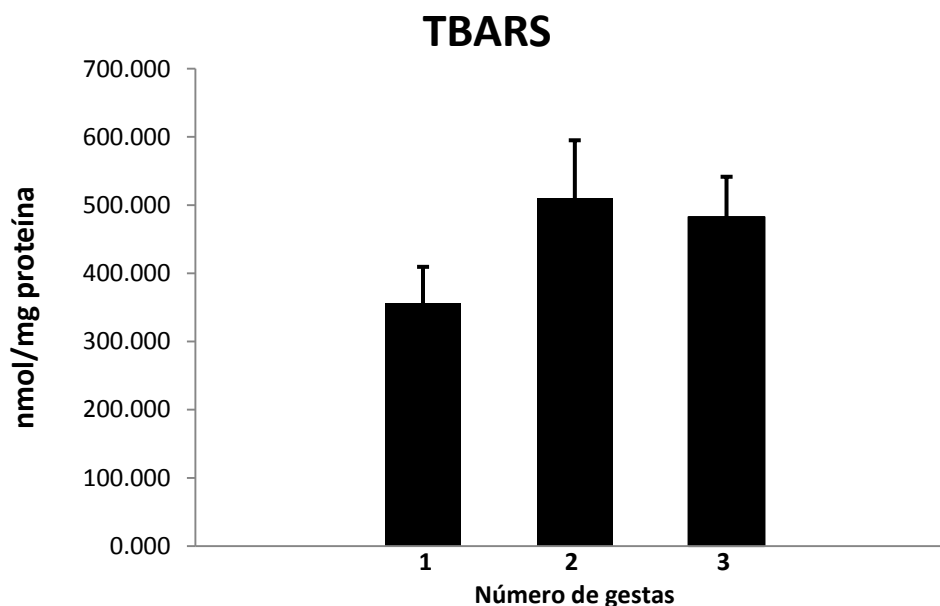


Figura 13. Niveles de peroxidación de lípidos, cuantificados como la concentración de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, nanomoles miligramo⁻¹ de proteína soluble) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas. Los resultados se presentan como promedio \pm error estándar.

En la figura 13 se observó, sin embargo, un aumento en la concentración de TBARS entre el primer y tercer grupo de aproximadamente 35.5%.

7.3.2 Daño oxidativo a proteínas

En la figura 14 se presentan los resultados de la concentración de carbonilos proteicos en relación al número de gestas. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de carbonilos proteicos entre el grupo con una gesta ($29.78 \mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína), el grupo con dos gestas ($14.08 \mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína) y el grupo con tres gestas ($13.08 \mu\text{mol mg}^{-1}$ proteína) ($p = 0.63$).

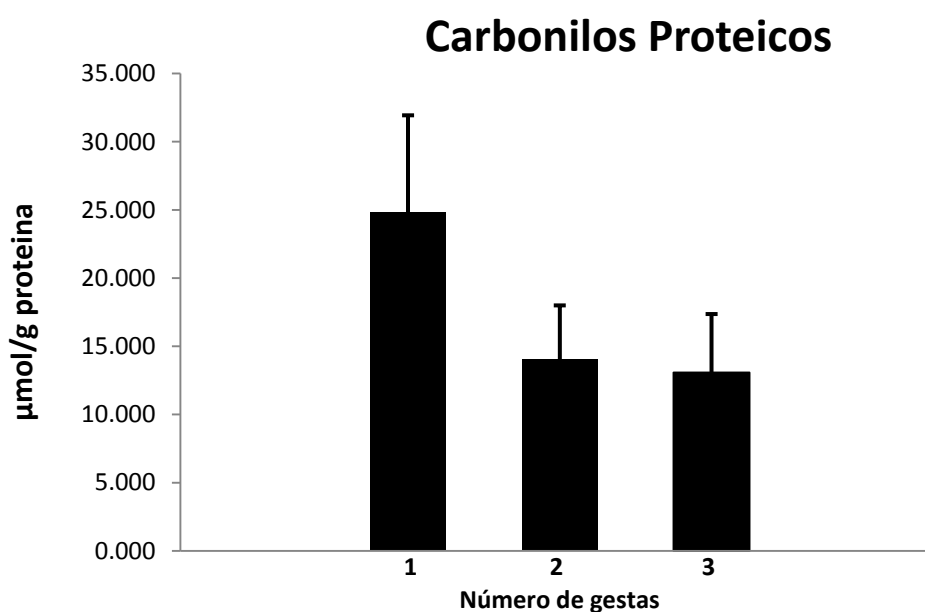


Figura 14. Concentración de carbonilos proteicos (micromoles gramo^{-1} de proteínas totales) en muestras de leche materna agrupadas por número de gestas. Los datos se presentan como promedio \pm error estándar.

A pesar de no encontrar diferencias entre grupos, en la figura 14 se observa una disminución en la concentración de carbonilos proteicos entre el primer y tercer grupo de 47.2%.

7.4 Relación entre la alimentación y los indicadores de estrés oxidativo

En la Tabla IV se presentan los resultados de los indicadores de estrés oxidativo en leche materna agrupados de acuerdo al tipo de alimentación. No se observaron diferencias significativas en los indicadores de estrés oxidativo entre los diferentes grupos de acuerdo a la frecuencia de consumo de pescado y mariscos.

Tabla IV. Indicadores de estrés oxidativo en muestras de leche materna en relación a la frecuencia de consumo de pescado y mariscos.

	Consumo de Pescado			Consumo de Mariscos		
	Menor (n = 20)	Mayor (n =25)	* p	Menor (n = 34)	Mayor (n = 11)	* p
TBARS	442.3 ± 71.40	455.7 ± 42.60	0.7	465.1 ± 49.37	402.6 ± 48.7	0.8
Prot. Carb.	11.8 ± 3.46	21.7 ± 4.74	0.4	12.5 ± 2.74	32.15 ± 8.25	0.1
GR	0.4 ± 0.21	0.41 ± 0.29	0.6	0.5 ± 0.24	0.13 ± 0.05	0.2
CAT	40.7 ± 13.51	30.6 ± 5.04	0.4	40.0 ± 8.47	19.80 ± 3.95	0.2
GST	0.2 ± 0.10	0.14 ± 0.02	0.9	0.2 ± 0.06	0.10 ± 0.01	0.2
GPx	1.00 ± 0.52	0.6 ± 0.23	0.4	0.9 ± 0.35	0.33 ± 0.08	0.3
SOD	652.5 ± 104.5	882 ± 110.1	0.4	784.9 ± 97.19	764 ± 113	0.9
GSH	33.9 ± 4.91	40.6 ± 9.58	0.5	40.5 ± 7.38	28.49 ± 4.72	0.6

TBARS = especies reactivas al ácido tiobarbitúrico, Prot. Carb. = proteínas carboniladas, GR = glutatión reductasa, CAT = catalasa, GST = glutatión-s-transferasa, GPx = glutatión peroxidasa, SOD = superóxido dismutasa, GSH = glutatión. Los datos se presentan como promedio ± error estándar. Menor consumo = nunca o al menos una vez por mes. Mayor consumo = una vez cada dos semanas o varias veces por semana. * = p<0.05, Kruskal-Wallis.

Mediante los análisis de correlación se observó una relación positiva entre la actividad de la enzima antioxidante SOD y el daño a lípidos (TBARS) de acuerdo a la frecuencia de consumo de pescado; $p=0.006$ ($r=0.59$) en menor consumo y $p=0.010$ ($r=0.50$) en mayor consumo de pescado (Anexo 6). También se obtuvo una correlación positiva entre la actividad de la enzima antioxidante SOD y el daño a lípidos (TBARS) de acuerdo a la frecuencia de consumo de mariscos, $p=0.0002$ ($r=0.59$) en menor frecuencia de consumo, y $p=0.70$ ($r=0.13$) en mujeres con mayor frecuencia de consumo de mariscos (Anexo 7).

7.5 Relación entre la edad y los indicadores de estrés oxidativo

Se realizó una correlación de Spearman para conocer la relación entre la edad de las mujeres lactantes y los indicadores de estrés oxidativo en leche materna; en dicha prueba no se encontró relación entre la edad de las mujeres lactantes y las defensas antioxidantes. Tampoco se encontró una relación entre el daño oxidativo a proteínas y lípidos con la edad de las mujeres (Anexo 4).

8. DISCUSIÓN

La leche materna es el mejor alimento para los infantes, ya que provee una nutrición óptima, se ha recomendado alimentar a los niños con ella por lo menos durante los primeros seis meses de vida (WHO, 2011). La leche humana contiene nutrientes específicos para la especie (proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas y minerales), necesarios para el desarrollo y la salud del infante (Picciano, 2001). Durante el periodo de lactancia, se lleva a cabo la liberación de reservas corporales para satisfacer las demandas energéticas del infante (Sauerwald et al., 2001); por otro lado, estos lípidos e incluso las proteínas contenidas en la leche pueden ser susceptibles a la oxidación causada por las especies reactivas de oxígeno. Si se sabe que la leche es el único alimento durante los primeros días de vida, ésta debe tener la mejor calidad y cubrir no sólo aspectos nutritivos e inmunológicos, sino también las necesidades antioxidantes de los recién nacidos contribuyendo a un desarrollo adecuado (Lipko-Przybylska y Kankofer, 2012). Por lo tanto, para contrarrestar el daño que las especies reactivas pueden causar en los nutrientes de la leche, se cuenta con defensas antioxidantes, las cuales constan de compuestos de bajo peso molecular, vitaminas, proteínas y enzimas (Picciano, 1998; Lindmark-Månsson y Åkesson, 2000).

8.1 DEFENSAS ANTIOXIDANTES

Se encontró un incremento del 45.6% en la actividad de SOD entre el grupo con una gesta y el grupo con tres o más gestas. De los tres tipos de enzimas SOD que se han identificado de acuerdo al metal unido a la enzima (manganeso, cobre/zinc o hierro) (Fridovich, 1986), en la leche materna se ha identificado principalmente la actividad de la Mn-SOD (Konisberg, 2008). La actividad de esta enzima es entre 10 y 25 veces mayor en leche que en suero humano (L'Abbe y Friel, 2000), además de que la actividad varía con el tiempo de lactancia, siendo mayor en la etapa de calostro y presentando una disminución después de 4 meses (Kasapović et al., 2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo, en cuanto a la actividad de esta enzima, superan los reportados por otros autores como L'Abbe y Friel (2000), quienes reportaron una actividad de $5.6 \text{ U SOD mg}^{-1}$ de proteína en muestras de leche obtenidas durante la segunda semana posparto, en un grupo

de mujeres de 24 a 44 años. Por otro lado, Kasapović et al. (2005) reportaron una actividad de SOD de 1.47 y 3.07 U mg⁻¹ de proteína (las muestras fueron tomadas los primeros 5 días y 3 semanas posparto, respectivamente), en un estudio en 36 mujeres, con una edad promedio de 26 años y pertenecientes a la población de Valjevo, Serbia. Ermis et al. (2005) en un grupo de mujeres de Erzurum, Turquía, cuyo rango de edad se encontraba entre 20 y 35 años, reportaron una actividad de SOD de 5 U mL⁻¹ de leche. Así mismo, Al-Awadi y Srikumar (2000), en un estudio realizado con mujeres de Kuwait, reportaron una actividad de 0.41 U mL⁻¹ en muestras tomadas entre 0 y 6 meses de lactancia (para una mejor comparación del presente trabajo con los últimos mencionados, la actividad registrada, en este trabajo, en esas unidades es de 37.3, 44.12 y 46.45 U mL⁻¹ de proteína para los grupos de 1, 2 y 3 o más gestas, respectivamente). En el estudio realizado por Al-Awadi y Srikumar (2000) se encontró que las mujeres de Kuwait presentaban una mayor actividad de SOD en comparación con mujeres de otras regiones, y al parecer la diferencia se debe a una mayor concentración de zinc (11%) en la leche materna, atribuido a la alimentación de las mujeres de esa región, este mineral es uno de los principales cofactores de esta enzima.

La actividad de CAT en el presente trabajo fue 65% mayor en el grupo de tres o más gestas que en el de una gesta. Al igual que en el caso de la SOD, los valores reportados para la actividad de CAT, son mayores que los encontrados en la bibliografía. Friel et al. (2002) reportaron una actividad de CAT de 0.82 U mg⁻¹ proteína en leche, en la segunda semana de lactancia, la cual es inferior a los valores reportados en este estudio.

En las mujeres con tres o más gestas se encontró que la actividad de GPx fue 205% mayor en el grupo de una gesta en comparación con el de tres o más gestas. Debski et al. (1987) detectaron actividad de GPx en la leche de varios mamíferos y encontraron que es responsable de aproximadamente la mitad del total de la actividad peroxidasa en la leche. Ermis et al. (2005) en un grupo de mujeres de Erzurum, Turquía, cuyo rango de edad se encontraba entre 20 y 35 años, reportaron una actividad de GPx de 90.8 U L⁻¹ (la actividad promedio para GPx en este estudio en las mismas unidades es de 702.3 U L⁻¹). De acuerdo a la literatura, los valores reportados para la actividad de GPx, son menores que los encontrados en este trabajo. Autores como L'Abbe y Friel (2000) reportaron una actividad

de 11 mU mg⁻¹ de proteína (0.011 U mg⁻¹ de proteína) en muestras de leche obtenidas durante la segunda semana posparto en un grupo de mujeres de 24 a 44 años. Bhatfacharya et al. (1988) reportaron una actividad promedio de GPx de 31.3 mU mL⁻¹ (la actividad promedio para GPx en este estudio en las mismas unidades es de 702 mU mL⁻¹), con una disminución en esta actividad con el tiempo (semanas) de lactancia; también Bhatfacharya et al. midieron el contenido de Se, el cual se encontraba en un rango de 15.5 a 0.2 ng mL⁻¹. Sin embargo, no encontraron correlación entre la actividad de GPx y el contenido de Se de la leche ($p > 0.3$), por lo que pudo inferir que la concentración de Se y la actividad de GPx no siempre están relacionadas. Por otra parte, Dodge et al. (1998) en un estudio con mujeres lactantes de china concluyen que la enzima GPx ejerce una importante función protegiendo contra la lipoperoxidación, lo cual se refleja en el perfil de ácidos grasos que se obtuvo de las mujeres del estudio, además encontró una correlación entre una adecuada ingesta de Se y un aumento en la concentración de ácido linoleico, sugiriendo también una relación entre un aporte adecuado de Se y una óptima actividad de GPx; la falta de Se, al parecer, disminuye la actividad de GPx, el exceso produce una saturación de la enzima lo que no incrementa la actividad (Dodge et al., 1998), lo que contribuye a una mejor protección contra la oxidación de lípidos en leche materna.

La actividad de GST en mujeres con tres o más gestas fue 117% mayor que en las mujeres con una gesta. Algunos tipos de GSTs tienen funciones similares a la GPx, catalizando la conversión de peróxidos orgánicos (excepto H₂O₂) a alcoholes, con ayuda de GSH para producir también GSSG (Halliwell y Gutteridge, 2007), por lo que contribuyen así a la protección contra la peroxidación. En estudios realizados por Lipko-Przybylska y Kankofer (2012) en cerdos, la actividad promedio de GST fue de 0.0036 y 0.0045 U mg⁻¹ de proteína en el primer y segundo o tercer parto, respectivamente; es decir, en cerdos la actividad de la enzima aumentó con el número de embarazos. En el presente trabajo, por el contrario, no se encontraron diferencias entre el número de gestas y la actividad de GST.

La actividad de GR fue 77% mayor en el grupo de una gesta que en el de tres o más gestas. Este decremento en la actividad de la enzima puede disminuir la concentración de GSH, el cual es necesario para llevar a cabo las reacciones antioxidantes y/o detoxificantes catalizadas por GPx y GST.

La concentración de GSH fue 18% menor en el grupo con una gesta que en el grupo con tres o más gestas. Se ha encontrado que el GSH y la GPx tienen la función de remover el H_2O_2 en eritrocitos (Gaetani et al., 1989; Johnson et al., 1994; Scott et al., 1991). Gaetani et al. (1989) demostraron que las enzimas peroxidasa, catalasa y GPx, presentan una actividad equivalente en la detoxificación de H_2O_2 en eritrocitos. En estudios realizados por Dumaswala et al. (1999), en eritrocitos humanos, encontraron una disminución en la concentración de GSH y GPx, pero no de catalasa, durante el almacenamiento de los glóbulos rojos; en este caso se observó una liberación de GSH por los eritrocitos como respuesta al estrés oxidativo (Thom et al., 1997). Tanto por la estabilidad de la catalasa como por los bajos niveles de la concentración de GSH, Dumaswala et al. (1999) sugieren que el GSH representa la primera línea de defensa contra la oxidación de lípidos y proteínas en eritrocitos humanos. En el presente estudio, el GSH puede estar realizando un papel similar en la leche materna, lo cual se ve reflejado en la disminución en su concentración, a pesar de no ser una diferencia estadísticamente significativa, la concentración de GSH, tiende a disminuir al llevar a cabo su función de donador de equivalentes reductores.

8.2 RELACIÓN ENTRE EL NÚMERO DE GESTAS Y LAS DEFENSAS ANTIOXIDANTES.

En este trabajo las mujeres primíparas (con una gesta) presentaron menor actividad antioxidante (SOD, GPx, GR, GST), con excepción de la actividad de GR y de la concentración de GSH. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos establecidos en relación al número de gestas; a diferencia de los estudios realizados en otras especies por autores como Lipko-Przybylska y Kankofer (2012), quienes en su estudio con cerdos encontraron una menor actividad en las enzimas SOD, GPx y GST en leche de las madres porcinas con una sola gesta, en comparación de las madres con 2 o más gestas. En un estudio en vacas (Puppel et al., 2012) a 90 ± 30 días de lactancia, divididas en dos grupos, primíparas y multíparas, las cuales fueron suplementadas con aceite de pescado y de semillas, se encontró un aumento en DHA y EPA, así como en las moléculas antioxidantes; el contenido de antioxidantes fue mayor en vacas primíparas.

8.3 RELACIÓN ENTRE EL DAÑO OXIDATIVO Y EL NÚMERO DE GESTAS

Se observó un aumento de 35.5% en la concentración de TBARS entre el grupo de una gesta y el de tres o más gestas. Se observó un aumento de 47.2% en la concentración de carbonilos proteicos entre el grupo de una gesta y el de tres o más gestas. Staicu et al. (2011) realizaron un estudio con dos grupos de ratas, primíparas y multíparas, se midió en sangre los indicadores de daño oxidativo, malondialdehído (MDA) y carbonilos proteicos, encontrando una mayor concentración de MDA en ratas primíparas (40%), y una mayor concentración de carbonilos proteicos en ratas multíparas (60%); Staicu et al. (2011) utilizaron como marcadores de defensa antioxidante, la capacidad donante de hidrógeno (HD) y el contenido total de grupos tiol (-SH), observando un aumento de HD (2%) en primíparas y un aumento de -SH en multíparas (50%). En el presente trabajo, se observó un aumento, tanto en el daño a lípidos como a proteínas, en relación con el aumento en el número de gestas; el incremento (no significativo) en el daño a proteínas concuerda con el estudio realizado en ratas por Staicu et al. (2011).

8.4 RELACIÓN ENTRE LA ALIMENTACIÓN DE ORIGEN MARINO Y LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

A diferencia de los animales terrestres, la cadena trófica marina comienza con protistas unicelulares fitoplanctónicos, en su mayoría algas, que contienen DHA y EPA, así como otros ácidos grasos ω -3 (Sargent, 1997). Estos organismos son fuente de alimento para el zooplancton, que a su vez es una fuente de alimento para peces teleósteos. Lo más importante es que, al avanzar en la cadena trófica no se llevan a cabo reacciones de hidrogenación; por lo tanto, los lípidos de pescado son ricos en ácidos grasos poliinsaturados, a diferencia de los animales terrestres que tienen gran cantidad de ácidos grasos saturados (Sargent, 1997). La proteína del pescado tiene alto valor nutricional; además, el pescado contiene ácidos grasos poliinsaturados ω -3, entre los que se encuentran el DHA y EPA. Estos últimos son esenciales para varias funciones en vertebrados, incluido el hombre. Estos lípidos pueden ser consumidos directamente o sintetizados a partir del ácido linolénico. Los peces también contienen ácidos grasos ω -6, especialmente el ácido

araquidónico (AA) que puede ser consumido o sintetizado a partir del ácido linoléico (Sargent, 1997). La conversión de ácido linoléico a AA compete dentro del cuerpo con la conversión del ácido linoléico a EPA y, por consiguiente, afecta también la conversión a DHA. Un exceso de AA genera un exceso de eicosanoides los cuales provocan problemas inflamatorios y cardiovasculares; pero esto puede ser evitado mediante un aumento en el consumo de EPA. El DHA es esencial para el desarrollo ocular y del cerebro; por lo tanto, es indispensable su consumo en etapas tempranas del desarrollo del ser humano (Sanders, 1993). Lo anterior se logra en mamíferos gracias a la alimentación con leche materna, la cual contiene ácidos grasos esenciales, entre ellos DHA. Se tiene evidencia acerca de que nuestros antepasados consumían ácidos grasos ω -6 y ω -3 en una proporción 1:1 (Simopoulous, 1991); pero en la actualidad, esta proporción no se cumple gracias a un aumento excesivo en el consumo de ácidos grasos ω -6, llegando incluso, en algunas regiones a proporciones de 50:1. Lo que nos lleva a la necesidad de lograr un aumento en el consumo de ácidos grasos ω -3 de cadena larga y, preferentemente, de manera preformada, sobre todo en edades tempranas, justificando el hecho de adicionarlos en fórmulas lácteas. La Fundación Británica de Nutrición y la Comisión del Grupo de Revisión Cardiovascular de Aspectos Médicos recomienda un aumento en la ingesta de pescado en el Reino Unido, sobre todo de pescado azul, ya que es rico en ω -3 (Sargent, 1997). Los pescados se pueden clasificar, con base en su contenido de lípidos, como azules o blancos (González et al., 2004). Las reservas de lípidos de los pescados azules (anchoa, angula, anguila, atún, bonito, caballa, cazón, chicharro, lamprea, palometa, pez espada, salmón y sardina) se localizan en el filete y representan aproximadamente un 20-30% del peso húmedo (Sargent, 1997, Pérez y Zamora, 2002). Por otro lado, los pescados blancos (bacalao, cabracho, lenguado, merluza, rape, faneca, congrio, gallo y rodaballo) almacenan la mayor parte de sus lípidos en el hígado y no en la carne (presentan 1-2% de lípidos), ya que al encontrar su alimento cerca, no necesita desplazarse grandes distancias y, por lo tanto, no necesita acumular grasa para hacer sus migraciones (Schwalme y Chouinard, 1999).

Sin embargo, a pesar de las diferencias, ambos tipos de pescado constan de altas concentraciones de DHA y EPA (Sargent, 1997). Prospéro-García et al. (2013) mencionan que los sistemas que regulan directamente la ingestión de alimento también promueven los

procesos cognitivos; por lo tanto, estos sistemas afectan la alimentación, regulando los hábitos alimenticios hacia el consumo de alimentos más saludables. La importancia del consumo de pescado radica en la mejora y prevención del deterioro de las funciones cognitivas a consecuencia de la edad, así como Alzheimer, traumatismos craneoencefálicos, trastorno por déficit de atención, hiperactividad, entre otros (Prospéro-García et al., 2013). Se enfatiza el beneficio en el consumo de pescado durante el embarazo, la lactancia y la niñez, lo cual ayuda al desarrollo cerebral del niño, mejora la función cognitiva y visual, e incluso beneficia a la madre ya que el consumo de pescado se asocia con menor prevalencia de depresión postparto (Prospéro-García et al., 2013).

En el presente trabajo, se midieron las diferencias entre los indicadores de estrés oxidativo en mujeres con diferentes frecuencias en cuanto al consumo de pescado y mariscos. Cabe destacar que la mayoría de las mujeres lactantes de este estudio presentaban una mayor frecuencia en el consumo de alimentos marinos, las mujeres que no consumían pescado o mariscos representan sólo el 9 y el 11%, respectivamente; quizás por ello no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Sin embargo, de acuerdo a los resultados del presente trabajo, se observó una relación positiva entre la actividad de la enzima antioxidante SOD y el daño a lípidos. Las mujeres que consumen pescado con menor frecuencia (nunca o una vez al mes) mostraron un coeficiente de correlación $r=0.59$ ($p=0.006$) y con el aumento en el consumo de pescado (una o varias veces por semana) el coeficiente calculado es $r=0.50$ ($p=0.010$). Ello sugiere que la relación entre SOD y el daño a lípidos disminuye con el aumento en el consumo de pescado. A pesar de que este aumento en el consumo provoca un incremento de 2.9 % en la concentración de TBARS, la actividad de SOD aumenta un 26%. Debido a que el pescado contiene gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, es más susceptible a la oxidación (Halliwell y Chirico, 1993; Esterbauer, 1993), lo que explica el aumento en TBARS. Pero el pescado también cuenta con antioxidantes como la vitamina E que protegen a las moléculas lipídicas, así como a proteínas, por lo que el aumento en hidroperóxidos no es significativo. Por otro lado, existe un incremento en el metabolismo energético en las mujeres lactantes, lo que puede estar provocando un incremento en la producción de ERO y, por ende, un incremento en la actividad antioxidante encargada de

neutralizarlas. Considerando que la enzima SOD se considera una de las primeras líneas de defensa antioxidante, que cataliza la dismutación de $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 (Halliwell y Gutteridge, 2007), el aumento en la actividad de esta enzima podría disminuir la concentración de $O_2^{\bullet-}$ y reducir el daño a lípidos.

También se observó una correlación positiva entre la actividad de la enzima antioxidante SOD y el daño a lípidos (TBARS) de acuerdo a la frecuencia de consumo de mariscos. Las mujeres que consumen mariscos con menor frecuencia (nunca o una vez al mes) mostraron un coeficiente de correlación $r=0.59$ ($p=0.002$) y con el aumento en el consumo de mariscos (una o varias veces por semana) el coeficiente calculado es $r=0.13$ ($p=0.07$). Lo que indica que sólo existe relación entre la SOD y los indicadores del daño a lípidos si se consumen menos mariscos, ya que el aumento en el consumo de éstos disminuye el daño a lípidos en un 15.5%. Esta disminución en la lipoperoxidación puede deberse a que los mariscos contienen menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados oxidables, además puede existir un aumento en el contenido de minerales tales como el Se (Simpson, 2012). El contenido de Se en peso fresco lleva el siguiente orden, alimentos marinos > carne comercial > cerdo > pollo (Zhang et al., 1993). El Se es cofactor de la enzima antioxidante GPx, la cual se ha comprobado que cataliza los hidroperóxidos, mediante la conversión del H_2O_2 a H_2O (Halliwell y Gutteridge, 2007); por lo tanto, se espera que un aumento en el consumo de mariscos mejore la calidad de las moléculas presentes en la leche materna que son necesarias para el desarrollo físico y mental del infante.

8.5 RELACIÓN ENTRE LA EDAD Y LOS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO

La teoría del envejecimiento por radicales libres establece que el deterioro de la función celular depende de la edad y se relaciona con la acumulación del daño oxidativo causado por ERO con la edad (Beckman y Ames, 1998; Golden et al., 2002). La producción de ERO es controlada por los antioxidantes, cuya concentración o actividad puede cambiar conforme avanza la edad; existen varios estudios acerca del efecto de la edad sobre la capacidad antioxidante en el organismo. Chakraborty et al. (2012) estudiaron el efecto del envejecimiento sobre el daño oxidativo a lípidos y proteínas, así como los

niveles de defensas antioxidantes presentes en glóbulos rojos y suero humano, en individuos entre 11 y 60 años y encontraron una disminución en la concentración de GSH y en la actividad de las enzimas CAT, SOD, GST, GPx y GR, así como un incremento en la oxidación de lípidos (cuantificada como la concentración de MDA) y proteínas (cuantificada como carbonilos proteicos) conforme aumenta la edad de los individuos. En vacas, en sus 90 días de lactancia, el mayor contenido de antioxidantes se encontró en las vacas primíparas, que fueron también las vacas más jóvenes (Puppel et al., 2012). En el presente trabajo no se encontró relación alguna entre la edad de las mujeres lactantes y las defensas antioxidantes. Tampoco se encontró una relación entre el daño oxidativo a proteínas y lípidos con la edad de las mujeres. Por lo tanto, es posible que las pequeñas variaciones en las defensas antioxidantes y el daño oxidativo observadas se deban a otros factores, como la alimentación, actividad física o contaminantes.

Por lo tanto, se recomienda en futuras investigaciones, tomar en cuenta otros posibles factores, que puedan afectar las defensas antioxidantes de las madres lactantes, ya que estos antioxidantes son responsables de proteger las moléculas funcionales de la leche materna; la cual es considerada como el mejor alimento para los infantes en sus primeros meses de vida, por lo que debe contar con la mejor calidad.

9. CONCLUSIONES

No se encontraron diferencias significativas en la actividad de las enzimas antioxidantes (CAT, SOD, GPx, GR y GST) ni en las concentraciones de antioxidantes no enzimáticos (GSH) en muestras de leche materna entre grupos en relación al número de gestas.

No se encontraron diferencias significativas en la concentración de TBARS y carbonilos proteicos en muestras de leche materna entre grupos en relación al número de gestas.

No se encontraron diferencias significativas en los indicadores de estrés oxidativo en muestras de leche materna por la edad de las madres.

Se observó una correlación positiva entre la actividad de SOD y los niveles de TBARS en muestras de leche materna. Esta correlación, aparentemente, está afectada por la frecuencia del consumo de pescado y mariscos.

10. LITERATURA CITADA

- Abramson J. L., Harper W. C., Jones D. P., Rhodes S. D. 2005. Association between novel oxidative stress markers and C-reactive proteins among adults without clinical coronary disease. *Atherosclerosis*. 178:115-21.
- Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. 105:121-126.
- Agostoni C., Trojan S., Bellú R., Riva E., Giovannini M. 1995. Neurodevelopmental Quotient of healthy term infants at 4 months and feeding practice: The role of long chain polyunsaturated fatty acids. *Pediatr Rev*. 38: 262-6.
- Al-Awadi F. M., Srikumar T. S. 2000. Trace Element Status in Milk and Plasma of Kuwaiti and Non-Kuwaiti Lactating Mothers. *Nutrition* 16:1069-1073.
- Álvarez-Cáceres R. 1995. Estadística Multivariante y No Paramétrica con SPSS: Aplicación a Las Ciencias de la Salud. Editorial Días de Santos. S.A. Madrid España. 316p.
- Andrews J., Vazquez M., Bowman G. 2006. Fat stability and preservation of fatty acids with Agrado antioxidant in feed ingredients used in ruminant rations. *J. Dairy Sci*. 89 1:60.
- Atalah E., Vera G., Rosselot G., Araya H., Andreu R., Alviña M., Araya M., Vargas V., Peñafiel K., Barba C., Pizarro T. 2008. Desarrollo, consumo y aceptabilidad de una bebida láctea con DHA para embarazadas y nodrizas. *Rev Chil Nutr* 35:4.
- Aycicek A., Erel O., Kocyigit O., Selek S., Demirkol M.R. 2006. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition* 22:616-9.
- Bates C. J., Tsuchiya H. 1990. Zn in breast milk during prolonged lactation. *Eur J Clin Nutr*. 44:61-9.
- Beard J. L., Connor J. R. 2003. Iron status and neural functioning. *Ann Rev Nutr* 23:41-58.
- Beard J., Stoltzfus R. 2001. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. *J Nutr* 131: 563-70312.
- Beckman K. B., Ames B. N. 1998. The free radical theory of ageing matures. *Physiol Rev* 78: 547-81.

- Bhatfacharya I., Picciano F., Milner J. A. 1988. Glutathione Peroxidase. *Biological Trace Element Research* 59:18.
- Black R. F., Jarman L., Simpson J. 1998. *The Support of Breastfeeding*, Vol. 1. Advantages and disadvantages of artificial feeding. 91-94.
- Bogdan D., Picciano M. F., Milner J. 1986. Selenium Content and Distribution of Human, Cow and Goat Milk. *American Institute of Nutrition*. 1091-1097
- Bosch V., Golfeno I., Alonso H., Laurentin Z., Materan M., García N. 2009. Ácidos grasos de la leche maternal de mujeres venezolanas de estratos socioeconómicos bajos: Influencia de la temperatura y tiempo de almacenamiento. *Arch. Latinoam. Nutr.* 59, 61-65
- Brenna J. T., Varamini B., Jensen R. G., Diersen-Schade D. A., Boettcher J. A., Arterburn L. M. 2007. Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am J Clin Nutr.* 85: 1457-64.
- Brzezinska-Slebodzinska E., Miller J. K., Quigley III J. D., Moore J. R., Madsen F. C. 1994. Antioxidant status of dairy cows supplemented prepartum with vitamin E and selenium. *J. Dairy Sci.* 77: 3087-3095.
- Buescher E. S., McIlheran S. M. 1992. Colostral antioxidants: separation and characterization of two activities in human colostrum. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 14: 47-56.
- Buescher E. S., McIlheran S. M., Frenck R. W. 1989 Further characterization of human colostrum antioxidants: identification of an ascorbate-like element as an antioxidant component and demonstration of antioxidant heterogeneity. *Pediatr Res.* 25: 266-270.
- Cadenas E. 1997. Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu Rev Biochem* 58:79-110.
- Campoy C., Cabero L., Sanjurjo P., Serra-Majem L., Anadón A., Morán J., Fraga J. 2010. Actualización, recomendaciones y consenso sobre el papel de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la gestación, lactancia.
- Canfield L. M., Giuliano A. R., Graver, E. J. C. 1995. Carotenoids, retinoids, and vitamin K in human milk. En: Jensen RG (Ed). *Handbook of milk composition*. San Diego: Academic Press; 693-705p.

- Casey C. E., Smith A., Zhang P. C. 1995. Microminerals in human and animal milks. En: Jensen R. G. (Ed). Handbook of milk composition. San Diego: Academic Press; 622-674.
- Castro-González M. I., Ojeda V. A. , Montaña B. S. , Ledesma C. E. , Pérez-Gil R. F. 2007. Evaluación de los ácidos grasos n-3 de 18 especies de pescados marinos mexicanos como alimentos funcionales. *57(1)*: 85-93.
- Caulfield L. E., Himes J. H., Rivera J. A. 1995. Nutritional supplementation during early childhood and bone mineralization during adolescence. *J Nutr.* 125:1104-1110.
- Céspedes E. M., Rodríguez C. K., Llópez J. K., Cruz M. K. 2000. Un acercamiento a la teoría de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento. *Rev Cubana Invest Biomed.* 19(3):186-90.
- Chakraborty S.P., Gautam N., Kundu P. K., Roy S. 2012. Age associated oxidative damage in RBC and serum of humans. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 268-274.
- Cochet B., Jung A., Griessen M., Bartholdi P., Schaller P., Donath A. 1983. Effects of lactose on intestinal calcium absorption in normal and lactase-deficient subjects. *Gastroenterology.* 84(5):935-40.
- Dalle-Donne I., Giustarini D., Colombo R., Rossi R., Milzani A. 2003. Protein carbonylation in human diseases. *Trends in Molecular Medicine.* 9:169-176.
- Debski B., Picciano M. F., Milner J. A., 1987. Selenium content and distribution of human, cow and goat milk. *J. Nutr.* 117:1091.
- Díaz-Acosta A. y Membrillo-Hernández J. 2006. Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas,* 9(1):34-44.
- Dodge M. L., Wander R. C., Xia Y., Butler, J. A., Whanger, P. D. 1998. Glutathione peroxidase activity modulates fatty acid profiles of plasma and breast milk in Chinese women. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 12: 221-230.

- Dumaswala U. J., Zhuo L., Jacobsen D. W., Jain S.K., Sukalski K. A. 1999. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: Role of glutathione. *Free Radical Biology and Medicine*, 27:1041–1049.
- Eberhardt M. 2001. Reactive oxygen metabolites. Chemistry and medical consequences. CRC Press.
- Emmet P., Rogers I. 1997. Properties of human milk and their relationship with maternal nutrition. *Early Human Development* 49:7-28.
- Ermis B., Yildirim A., Örs R., Tastekin A., Ozkan B., Akcay F. 2005. Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and antioxidant potential levels in mothers at the postpartum seventh day. *Biological Trace Element Research* 105, 29-36.
- Esterbauer H. 1993. Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 57: 779–786.
- Folh e L., G nzler W. A., 1984. Assays for glutathione peroxidase. En: Packer L. (eds). *Methods in Enzymology. Oxygen Radicals in Biological Systems* Academic Press Inc New York, USA. 114-120p.
- Forrellat M., Gautier H., Fernandez N. 2000. Metabolismo del hierro. *Rev. Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 16(3):144-160.
- Fridovich I. 1986. Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology* 58, 61±97.
- Friel J. K., Martin S. M., Langdon M., Herzberg G. R., Buettner G. R. 2002. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res*; 51:612–8.
- Gaetani G. F., Ferraris A. M., Rolfo M., Mangerini R., Arena S., Kirkman, H. N. 1996. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen peroxide within human erythrocytes. *Blood* 87:1595–1599.
- Gaetani G. F., Galiano S., Canepa L., Farraris A. M., Kirkman H. N. 1989. Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood* 73:334–339.

- Gaete M., Atalah E., Araya J. 2002. Efecto de la suplementación de la dieta de la madre durante la lactancia con ácidos grasos omega 3 en la composición de los lípidos de la leche. *Rev Chil Pediatr*; 73: 239-47.
- Gaull G. E. 1989. Taurine in pediatric nutrition: review and update. *Pediatrics* 83:433-442.
- Gibson R. A., Kneebone G. M. 1981. Fatty acid composition of human colostrum and mature breast milk. *Am J Clin Nutr.* 34(2):252-7.
- Gibson R., Neumann M., Makrides M. 1997. Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants. *Eur J Clin Nutr*; 51: 578-84.
- Goldberg D. M, Spooner R. J. 1983. Glutathione reductase. En: Bergmeyer, H. U. (Ed). *Methods of Enzymatic Analysis*. Nueva York. 258-265 p.
- Golden T. R., Hinerfeld D. A., Melov S. 2002. Oxidative stress and aging: Beyond correlation. *Aging Cell* 1:117-123.
- González J. M., Del Castillo L., García M., Alarcón R., Ochoa O., Junquera C., Ania J., Rivera J. 2004. *Empleado de Servicios Múltiples Del Servicio Navarro de Salud. Temario Y Test*. Ed. MAD S. L. España. 330 p.
- Goyal M., Basak A. 2010. Human catalase: looking for complete identity. *Protein Cell* 1(10): 888–897
- Greenwald R. 1990. "Current approaches to the development of oxygen radical scavengers", en *Drugs of Today*. 26: 299-307.
- Griffith O. W. 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2- vinylpyridine. *Anal Biochem*; 106:207-212.
- Gudiel-Urbano M., Goñi I. 2001. Oligosacáridos de la leche humana. Papel en la salud y en el desarrollo del lactante. *Arch Latinoamer Nutr* 51(4):332-39.
- Gutteridge J. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species*. Exford University Press, Londres 91-95 pp.
- Gutteridge J. y Halliwell B. 1999. *Reactive oxygen species in biological systems*, USA: D.L. Gilbert and C.A. Colton, Eds. New York 189-218 pp.

- Habig, W. H. Jakoby, W.B.1981. Glutathione S-transferases (rat and human). *Methods Enzymol.* 77:218-235.
- Hadders-Algra M., Bouwstra H., Van Goor S. A., Dijck-Brouwer D. A., Muskiet F. A. 2007. Prenatal and early postnatal fatty acid status and neurodevelopmental outcome. *J Perinat Med*; 35 Suppl 1:S28-34.
- Halliwell B., Chirico S. 1993. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr* 57:715–725.
- Halliwell B., Gutteridge J.M. 2007. *Free radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press.
- Hamosh M. 1998. Protective functions of proteins and lipids in human milk. *Biol Neonate*; 74:163-176.
- Hanna N., Ahmed K., Anwar M., Petrova A., Hiatt M. 2004. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch. Dis. Child Fetal Neonatal*. Ed. 89: F 518-520.
- Hanning R. M., Paes B., Atkinson S. A. 1992. Protein metabolism and growth of term infants in response to a reduced protein, 40:60 whey: casein formula with added triptophan. *Am J Clin Nutr* 56:1004-1011.
- Harris W., Connor W., Lindsey S. 1984. Will dietary n-3 fatty acids change the composition of human milk? *Am J Clin Nutr* 40: 780-5.
- Harzer G., Haug M., Bindels J. G. 1986. Biochemistry of human milk in early lactation. *Z. Ernährungswiss* 25:77-90.
- Hawkes W. C., Wilhelmsen E. C., Tappel A. L. 1985. Abundance and tissue distribution of selenocysteine-containing proteins in the rat *J. Inorg. Biochem.*, 23:72-73.
- Heine W. E., Klein P. D., Reeds P. J. 1991. The importance of α -lactalbumin in infant nutrition. *J Nutr*; 121: 277-283.
- Henderson R., Jensen R., Lammi-Keefe C., Ferris A., Dardick K. 1992. Effect of fish oil on the fatty acid composition of human milk and maternal and infant erythrocytes. *Lipids* 27: 863-9.
- Hermes-Lima M., Storey K. B. 1995. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase from an estivating land snail. *Z Naturforsch C.* 50:685-694.

- Hermes-Lima M., Storey K. B. 1998. Role of antioxidant defenses in the tolerance of severe dehydration by anurans. The case of the leopard frog *Rana pipiens*. *Mol Cell Biochem.* 189:79-89.
- Herrera J. Aspectos preventivos de la ingesta de calcio en los diferentes ciclos vitales del ser humano. 2002. *Colombia Médica* Vol. 33 N° 1.
- Hoffman D. R., Birch E. E., Birch D.G. 2000. Impact of early dietary intake and blood lipid composition of long chain polyunsaturated fatty acids on later visual development. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31: 540-53.
- Hojo Yasuji. 1986. Sequential study on glutathione peroxidase and selenium contents of human milk. *52:1-2,83-91.*
- Hübner-Woźniak E., Okecka-Szymańska J., Stupnicki R., Malara M., Kozdroń E. 2011. Age-related blood antioxidant capacity in men and women. *J Med Biochem* 30:103-108.
- Innis S. M. 2007. Human milk: maternal dietary lipids and infant development. *Proc Nutr Soc* 66:397-404.
- Jannat B., Oveisi M. R., Sadeghi N., Behafar A., Hajimahmoodi M., Jannat F. Khoshnamafar S. 2008. Life Prediction of Infant Formula by Using Rancidity Test. *Iranian J. Pharm. Res.* 7: 269-273.
- Jensen C., Maude M., Anderson R., Heird W. 2000. Effect of docosahexaenoic acid supplementation of lactating women on the fatty acid composition of breast milk lipids and maternal and infant plasma phospholipids. *Am J Clin Nutr* 71: 292-9.
- Jensen R., Lammi-Keefe C., Henderson R., Bush V., Ferris A. 1992. Effect of dietary intake of n-6 and n-3 fatty acids on the fatty acid composition of human milk in North America. *J Pediatr* 120: 87-92.
- Jerlick A., Pitt A. R., Schaur R. J., Spickett C. M. 2000. Pathway of phospholipid oxidation by HOC1 in human LDL, detected by LC-MS. *Free Radic Biol Med* 28(5):673-82.
- Kasapović J., Pejić S., Mladenović M., Radlović N., Pajović S. B. 2005. Superoxide dismutase activity in colostrum, transitional. *The Turkish Journal of Pediatrics* 47: 343-347.

- Kinsella J. E.; Frankel, E., German B., Kanner J. 1993. "Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plants foods", en Food Technology 85-89 pp.
- Kobata A. 1978. Milk glycoproteins and oligosaccharides. En: Horowitz, M., Pigman, W., eds. Mammalian glycoprotein and glycolipids I:423-440.
- Koletzko B., Rodriguez-Palmero M., Demmelmair H., Fidler N., Jensen R., Sauerwald T. 2001. Physiological aspects of human milk lipids. Early Hum Dev 6:3-18.
- Konisberg M. 2008. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Ed. Manual moderno.
- Kunz C., Rudloff S. 1993. Biological functions of oligosaccharides in human milk. Acta Paediatr. 82: 903-912.
- L'Abbe M. R, Friel J. K. 2000. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. J Pediatr Gastroenterol Nutr 31:270-4.
- Lammi-Keefe, C. J. y Jensen R. G. 1984. Lipids in human milk: A Review. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 3, 172-198.
- Lawrence R. A., Lawrence R. M. 2007. La lactancia materna: una guía para la profesión médica. Ed. Elsevier Mosby. Sexta edición. Madrid, España. 116-124 p.
- Levine A., Tenhaken R., Dixon R., Lamb C. 1994. H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. 79:583-93.
- Lien E. L. 2003. Infant formulas with increased concentrations of α -lactalbumin. Am J Clin Nutr; 77:1555-1558.
- Lindblad B. S. y Rahimtoola R. J. 1974. A pilot study of the quality of human milk in a lower socioeconomic group in Karachi, Pakistan. Acta Paediatr. Scand. 63, 125-128.
- Lindmark- Månsson H., Åkesson B. 2000. Antioxidative factors in milk. British Journal of Nutrition, 84, Suppl. 1:103-110.
- Lipko-Przybylska J. Kankofer M. 2012. Antioxidant defence of colostrum and milk in consecutive lactations in sows. Irish Veterinary Journal 65:4.

- Lonnerdal B. 1985. Biochemistry and physiological functions of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 42:1299-1317.
- Lonnerdal B. 1997. Effects of milk and milk components on calcium, magnesium, and trace element absorption during infancy. *Physiol Rev* 77:643-669.
- Lonnerdal B. 1998. Copper nutrition during infancy and childhood. *Am J Clin Nutr* 67:1046-53.
- Lonnerdal B. 2003. Nutritional and physiologic significance of human milk proteins. *Am J Clin Nutr* 77:1537- 1543.
- Lozzof B., Jimenez E., Wolf A. W. 1991. Long-term developmental outcome of infants with iron deficiency. *New Eng J Med* 325:687-694.
- Makrides M., Neumann M., Gibson R. 1996. Effect of maternal docosahexaenoic acid (DHA) supplementation on breast milk composition. *Eur J Clin Nutr* 50: 352-7.
- Martínez V., Aranceta J., Dalmau J., Gil A., Lama R., Martín M., Moreno J, Pavón P., Suárez L. 2009. Recomendaciones nutricionales en la infancia. *JANO*. 1749:42-47.
- Mena P., Milad A. 1998. Variaciones en la composición nutricional de la leche materna. Algunos aspectos de importancia clínica. *Rev. Chil. Pediatr.* 69:116-121.
- Migliore-Samour D., Jolles P. 1988. Casein: a prohormone with an immunomodulating role for the newborn? *Experientia* 44:188-193.
- Milner J. A., Sherman L., Picciano M. F. 2008. Distribution of selenium in human milk. *Am J Clin Nutr* 88:70 –6
- Moreira E. y García M. 1997. Lactancia materna y vitamina A. Hospital Pediátrico Docente "Juan M. Márquez". *Rev Cubana Aliment Nutr* 11(1):58-60.
- Murray R. K. 1997. Eritrocitos y leucocitos. En: *Bioquímica de Harper*. Murray R. K, Mayes P. A., Granner D. K. eds. El Manual Moderno, S. A.; México DF. 863 p.
- Neuringer M. 2000. Infant vision and retinal function in studies of dietary long-chain polyunsaturated fatty acids: methods, results, and implications. *Am J Clin Nutr* 71: 256-67.
- Neville M. C. 1995. Determinants of milk volumen and composition. En Jensen R. G. Ed. *Handbook of Milk Composition*. San Diego. Academic Press.

- Newburg D. S. 2000. Oligosaccharides in human milk and bacterial colonization. *J Pediatr Gastr Nutr.* 30: 8-17.
- Newburg D. S., Neubauer S. H. 1995. Carbohydrates in milk: analysis, quantities, and significance. En: Jensen R. G. (Ed). *Handbook of milk composition.* Academic Press. San Diego 273-349p.
- Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 95:351-8.
- Pérez F., Zamora S. 2002. *Nutrición y alimentación humana.* Ed. Aula de mayores. Universidad de Murcia. 134-135 p.
- Persky A. M., Green P. S., Stubley L., Howell C.O., Zaulyanov L., Brazeau G.A., Simpkins J.W. 2000. Protective effect of estrogens against oxidative damage to heart and skeletal muscle in vivo and in vitro. *Proc Soc Exp Biol Med.* 223:59-66.
- Peterson J.A., Patton S., Hamosh M. 1998. Glycoproteins of the human milk fat globule in the protection of the breast-fed infant against infections. *Biol Neonate* 74:143-162.
- Picciano M. F. 2001. Nutrient Composition of Human Milk. *Pediatric Clinics of North America* 48(1):53-67
- Picciano M. F. Human milk: nutritional aspects of a dynamic food. *Biol Neonate* 1998; 74: 84-93.
- Poiffait A, Adrian J. 1994. Composition minérale du lait de femme: 2- Oligoéléments. *Médecine et Nutrition* 30:63-71.
- Poiffait A., Adrian J. 1993. Composition minérale du lait maternel: 1- Macroéléments. *Médecine et Nutrition* 29:163-171.
- Portela M. 2003. *Vitaminas y minerales en nutrición.* 2ª ed. Buenos Aires: La Prensa Médica Argentina.
- Prentice A. 1996. Constituents of human milk. *Food and Nutr Bull* 17:305-315.
- Prospéro-García O., Méndez M., Alvarado I., Pérez M., López J., Ruiz A. 2013. *Inteligencia para la alimentación, alimentación para la inteligencia.* *Salud Mental* 36:101-107.

- Puppel K., Nałecz-Tarwacka T., Kuczynska B., Golebiewski M., Kordyasz M., Grodzki H. 2012. The age of cows as a factor shaping the antioxidant level during a nutritional experiment with fish oil and linseed supplementation for increasing the antioxidant value of milk. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 92(12): 2494–2499.
- Rangon V., Bulkley G. B. 1993. Prospects for treatment of free radicals-mediated tissue injury. *Br Med Bull* 49:700-18.
- Requena J. R., Levine R. L., Stadtman, E. R. 2003. Recent advances in the analysis of oxidized proteins. *Amino acids* 25:221-226.
- Reylli P. M., Burkley G. B. 1990. Tissue injury by free radicals and other toxic oxygen metabolites. *Br J Surg* 77:1324-5.
- Rogers I. S., Emmett P., Holding J. 1997. The growth and nutritional status of the breast-fed infant. *Early Hum Dev*; 49:157-174.
- Ronayne de Ferrer P. A. 2000. Importancia de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga en la alimentación del lactante. *Arch Argent Pediatr.* 98:231-238.
- Rosenfeld E., Beyerlein A., Hadders-Algra M., Kennedy K., Singhal A., Fewtrell M., Lucas A., Koletzko B., Von Kies R. 2009. IPD meta-analysis shows no effect of LCPUFA supplementation on infant growth at 18 months. *Acta Pediatr.* 98:91-97.
- Sadeghi N., Oveisi M. R., Jannat B., Hajimahmoodi M., Bonyani H., Jannat F. 2009. Incidence of aflatoxin M1 in human breast milk in Tehran, Iran. *Food Control* 20:75-78.
- Saint L., Smith M., Hartmann P. E. 1984. The yield and nutrient content of colostrum and milk giving birth to 1 month post partum, *Br. Nutr.* 52(1):87-95.
- Sala-Vila A., Miles E. A., Calder P. C. 2008. Fatty acid abnormalities in atopic disease: evidence explored and the role in the disease process examined. *Clin Exp All* 38:1432–1450.
- Salem N., Wegher B., Mena P., Uauy R. 1996. Arachidonic and docosahexaenoic acids are biosynthesized from their 18-carbon precursors in human infants. *Proc Natl Acad Sci* 93: 49-54.

- San Giovanni J., Berkey C., Dwyer J., Colditz. 2000. Dietary essential fatty acids, long-chain polyunsaturated fatty acids, and visual resolution acuity in healthy fullterm infants: a systematic review. *Early Hum Dev* 57: 165-88.
- Sanders T. A. B. 1993. Marine oils: metabolic effects and role in human nutrition *Proceedings of the Nutrition Society* 52:451- 457.
- Sanders T. A. B., Reddy S. 1992. The influence of a vegetarian diet on the fatty acid composition of human milk and the essential fatty acid status of the infant. *The Journal of Pediatrics*. 120:4:71–77.
- Sanjurjo, Trebolazabala N., Aldámiz-Echevarría L., Castaño L., Prieto J., Lodeiro A. 2008. Ácidos grasos n-3 y n-6 en plasma al nacer y al año de edad y relación con el tipo de alimentación. *An. Pediatr.* 68, 570-575.
- Sargent J. R. 1997. Fish oils and human diet. *British Journal of Nutrition* 78(19):5-13.
- Sathe S. K., Mason A. C., Rodibaugh R., Weaver C. M. 1992. *J. of Agriculture and Food Chem.* 40, 2084-2091.
- Sauerwald T. U., Demmelmair H., Koletzko B. 2001. Polyunsaturate fatty acid supply with human milk. *Lipids* 36:991-996.
- Schwalm K. y Chouinard G. A. 1999. Seasonal dynamics in feeding, organ weights, and reproductive maturation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) in the southern Gulf of St Lawrence. *ICES Journal of Marine Science* 56: 303–319.
- Scott M. D., Lubin B. H., Zuo L., Kuypers F. A. 1991. Erythrocyte defense against hydrogen peroxide: preeminent importance of catalase. *J. Lab. Clin. Med.* 118:7–16.
- Shellhorn C., Valdés V. 1995 La leche humana, composición, beneficios y comparación con la leche de vaca. *Manual de Lactancia para Profesionales de la Salud*. Comisión de Lactancia MINSAL, UNICEF. Chile
- Shoji H., Shimizu t., Shinohara K., Oguchi S., Shiga S., Yamashiro Y. 2004. Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal* 89:136-138.
- Sies H. 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 82, 291-295.

- Simopoulos A. P. 1991. Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr.* 54(3):438-63.
- Simopoulos A.P., Kifer R.R., Martin R.E., Barlow S.W. 1991. Health effects of ω -3 polyunsaturated fatty acids in seafoods. *World Rev Nutr Diet.* Basel: Karger. Vol. 66.
- Simpson B., Nollet L., Toldrá F., Benjakul S., Paliyath G., Hui Y. 2012. *Food Biochemistry and Food Processing.* Second edition. Ed Wiley- Blackwell 345-349 p.
- Sohal R. S., Sohal B. H., Brunk U.T. 1990. Relationship between antioxidant defenses and longevity in different mammalian species. *Mech Ag Dev* 53:217-27.
- Staicu M. L., Mureşan A., Tache S., Moldovan R. 2011. Effects of exogenous antioxidants on oxidative stress in pregnancy *J Med Life.* 4(2):163–167.
- Stansby M. E. y Hall A.S. 1967. Chemical composition of commercially important fish of the USA. *Fish Ind Res.*, 3, 29-34.
- Thom S. R., Kang M., Fisher D., Ischiroupoulos H. 1997. Release of glutathione from erythrocytes and other markers of oxidative stress in carbon monoxide poisoning. *J. Appl. Physiol.* 82:1424– 1432.
- Thornalley P. J. y Vasak, M. 1985. "Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress. Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals", en *Biochimica et Biophysica Acta* 827, 36-44 pp.
- Tomassi G. 2002. Phosphorus: an essential nutrient for human diet. *IMPHOS Newsletter* 16: 1- 3
- Turolí D., Testolin G., Zanini R., Bellu R. 2004. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr.* 93: 1569 -1574.
- Uauy R. 1994. Nonimmune system responses to dietary nucleotides. *J Nutr* 124:157-159.
- Valdés V., Pérez A., Labbok M. 1994. Fisiología de la glándula mamaria. En: *Lactancia para la Madre y el Niño*, Ed. Santiago Mediterráneo, 21 p.
- Valenzuela A., Nieto S. 2001. Acido docosahexaenoico (DHA) en el desarrollo fetal y en la nutrición materno- infantil. *Rev Méd Chile* 129:1203-1211.

- Valenzuela A., Nieto S. 2003. Ácidos grasos omega-6 y omega-3 en la nutrición perinatal: su importancia en el desarrollo del sistema nervioso y visual. *Rev. Chil. Pediatr.* 74, 149-157.
- Vargas-Sabadías A. 1995. *Estadística Descriptiva e Inferencial*. Editorial Universidad de Castilla-La Mancha. Murcia, España. 490-496 pp.
- Vázquez-Medina J. P., Zenteno-Savín T., Elsner R. 2007. Antioxidant enzymes in ringed seal tissues: potential protection against dive-associated ischemia/reperfusion. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology.* 345:110-118.
- WHO. World Health Organization. Administración de suplementos de vitamina A a lactantes de 1 a 5 meses de edad 2011. Disponible en: http://www.who.int/mediacentre/news/Statements2011/breastfeeding_20110115/en/inde.html
- WHO. World Health Organization. ZINC. 1996. En: *Trace elements in human health*. Geneva: WHO. 72-104 pp.
- World Association of Perinatal Medicine Dietary Guidelines Working Group. The roles of long-chain polyunsaturated fatty acids in pregnancy, lactation and infancy: review of current knowledge and consensus recommendations. *J Perinat Med* 36:5-14.
- Xanthou M. 1998. Immune protection of human milk. *Biol Neonate.* 74:121-133.
- Zar J. H. 1996. *Biostatistical analysis*. Prentices Hall, New Jersey. 918 pp.
- Zhang X., Shi B., Spallholz J. E. 1993. The selenium content meats, seafood, and vegetables from Lubbock, Texas. *Food and Nutrition. Biological trace element research.* 39:162-169.
- Zoeren V., Grobden D., Lindeman J. H., Houdkamp E., Brand R., Schrijver J., Berger H. M. 1994. Postnatal changes in plasma chain-breaking antioxidants in healthy preterm infants fed formula and/or human milk. *Am J Clin Nutr.* 60:900-6.

11. ANEXOS

Anexo 1. Cuestionario aplicado las mujeres lactantes

FICHA DE IDENTIFICACIÓN			
Nombre			
Fecha de nacimiento			
Lugar de nacimiento			
Edad			
Peso			
Talla			
Domicilio			
Calle			
Municipio			
Estado			
Preguntas:	Si	No	
1.- ¿En los últimos 5 años ha viajado o residido en otro lugar al que ocupa ahora?			
2.- ¿En dónde, municipio y estado?			
3.- ¿Ha estado embarazada antes?			
4.- ¿Cuántas veces ha estado embarazada (incluyendo esta vez)? <i>1, 2, 3, 4, 5 o más</i>			
5.- Fecha de parto, cesárea o aborto ANTERIOR A ESTE:			
6.- ¿Cuántos hijos vivos?			
8.- ¿Ha cuantos hijos has amamantado? <i>1, 2, 3, 4 o más</i>			
9.- Si lo hizo, ¿por cuánto tiempo?			
10.- ¿Está en alguna dieta especial?			
Cual:			
11.- ¿Hay algunos alimentos que limita, evita o no come?			
Cuáles:			
12.- ¿Es usted vegetariana?			
13.- Con qué frecuencia come usted pescado: <i>Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la quincena, varias veces a la semana</i>			
14.- Con qué frecuencia come usted mariscos: <i>Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la quincena, varias veces a la semana</i>			
Preguntas:	Si	No	
15.- Con qué frecuencia come usted leche o queso: <i>Nunca, 1 vez al mes, 1 vez a la semana, varias veces a la semana</i>			
16.- ¿Consume algunos de estos productos?			

<i>Vitaminas prenatales</i>		
<i>Otras vitaminas/minerales</i>		
<i>Hierbas</i>		
<i>Pastillas con hierro</i>		
<i>Aceite de pescado, omega 3</i>		
<i>Laxantes</i>		
<i>Medicamentos sin prescripción médica (Aspirina, tylenol, etc)</i>		
<i>Ninguno</i>		
<i>Otros</i>		
<i>Remedios caseros</i>		
17.- ¿Cuáles de estas condiciones tiene?		
<i>Alta presión</i>		
<i>Anemia</i>		
<i>Diabetes</i>		
<i>Acidez</i>		
<i>Enfermedades renales</i>		
<i>Estreñimiento</i>		
<i>Ninguna</i>		
<i>Otra</i>		
18.- ¿Fuma o alguien en la casa fuma?		
19.- ¿Dónde trabaja? <i>casa</i>		
<i>Oficina</i>		
<i>Agrícola</i>		
<i>Comercio</i>		
<i>Industria</i>		
<i>Taller (coches, pintura, eléctrico)</i>		

Anexo 2. Indicadores de estrés oxidativo en leche materna.

	Grupo 1 <i>n=15</i>	Grupo 2 <i>n=15</i>	Grupo 3 <i>n=15</i>
TBARS (nmol mg ⁻¹ prot)	356.23 ± 53.27	510.43 ± 84.61	482.68 ± 58.79
Prot. Carb. (μmol prot carb. mg ⁻¹ prot)	24.78 ± 7.15	14.08 ± 3.92	13.08 ± 4.28
GR (U mg ⁻¹ prot)	0.48 ± 0.27	0.60 ± 0.48	0.11 ± 0.02
CAT (U mg ⁻¹ prot)	28.80 ± 6.81	28.90 ± 5.58	47.50 ± 17.71
GST (U mg ⁻¹ de prot)	0.135 ± 0.04	0.125 ± 0.03	0.2930 ± 0.13
GPx (U mg ⁻¹ prot)	0.38 ± 0.14	0.87 ± 0.40	1.16 ± 0.68
SOD (U mg ⁻¹ prot)	615.16 ± 153.55	828.80 ± 147.38	895.50 ± 93.91
GSH (nmol mg ⁻¹ de prot)	41.86 ± 15.60	36.60 ± 5.32	34.29 ± 587

Los datos, agrupados según el número de gestas, se presentan como promedio ± error estándar. TBARS=sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Prot. Carb= carbonilos proteicos, GR=glutación reductasa, CAT=catalasa, GST=glutación-S-transferasa, GPx=glutación peroxidasa, SOD=superóxido dismutasa, GHS=glutación. *=Diferencias significativas entre grupos, p<0.05.

Anexo 3. Comparaciones entre grupos dependiendo del número de gestas.

	Mediana	Percentil 25 / 75	**Dif %	*p
Prot. Carb.				
GI	6.46	3.824/52.136	1.00	
GII	6.12	4.458/21.427	-5.20	
GIII	6.44	2.227/14.205	5.28	0.63
TBARS				
GI	307.31	234.139/498.787	1.00	
GII	467.94	324.57/693.426	52.27	
GIII	419.40	280.808/540.885	36.47	0.23
GR				
GI	0.07	0.047/0.126	1.00	
GII	0.05	0.02/0.157	-24.16	
GIII	0.08	0.035/0.155	48.83	0.77
CAT				
GI	20.76	13.59/30.262	1.00	
GII	24.67	15.902/31.515	18.86	
GIII	24.06	13.544/46.548	15.90	0.87
GST				
GI	0.08	0.048/0.164	1.00	
GII	0.11	0.049/0.162	33.03	
GIII	0.17	0.069/0.202	94.50	0.29
GPx				
GI	0.13	0.088/0.512	1.00	
GII	0.20	0.113/0.505	50.96	
GIII	0.30	0.059/0.687	127.28	0.95
SOD				
GI	375.16	178.828/893.543	1.00	
GII	829.53	252.86/1251.074	121.12	
GIII	905.48	802.235/1008.113	141.36	0.20
GSH				
GI	26.43	16.43/38.163	1.00	
GII	33.48	23.886/51.145	26.67	
GIII	31.95	14.94/47.26	20.89	0.70

TBARS=sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Prot. Carb= carbonilos proteicos, GR=glutación reductasa, CAT=catalasa, GST=glutación-S-transferasa, GPx=glutación peroxidasa, SOD=superóxido dismutasa, GHS=glutación. *=Diferencias significativas entre grupos, $p < 0.05$, por Kruskal-Wallis. **Diferencia porcentual de las medianas

Anexo 4. Correlación entre la edad de las mujeres lactantes y los indicadores de estrés oxidativo en leche materna.

	<i>Edad</i>	
	<i>r</i>	<i>p</i>
IMC	0.119	0.43
GR	0.024	0.87
CAT	-0.20	0.17
GST	0.28	0.06
GPx	-0.20	0.19
SOD	0.17	0.26
GSH	-0.060	0.69
TBARS	0.049	0.75
Prot. Carb.	-0.111	0.47

IMC= Índice de masa corporal, TBARS=sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Prot. Carb= carbonilos proteicos, GR=glutación reductasa, CAT=catalasa, GST=glutación-S-transferasa, GPx=glutación peroxidasa, SOD=superóxido dismutasa, GSH=glutación.

Anexo 5. Comparaciones entre grupos según frecuencia de consumo de pescado y mariscos.

	Consumo de Pescado		Consumo de Mariscos	
	Menor (n = 20)	Mayor (n = 25)	Menor (n = 34)	Mayor (n = 11)
TBARS (nmol mg ⁻¹ prot)	442 ± 319	456 ± 213	465 ± 288	403 ± 162
Prot. Carb. (μmol prot carb. mg ⁻¹ prot)	11.8 ± 15.5	21.69 ± 23.7	12.51 ± 15.97	32.15 ± 27.35
GR (U mg ⁻¹ prot)	0.38 ± 0.95	0.41 ± 1.45	0.48 ± 1.41	0.13 ± 0.18
CAT (U mg ⁻¹ prot)	40.7 ± 60.4	30.6 ± 25.2	40 ± 49.4	19.80 ± 13
GST (U mg ⁻¹ prot)	0.24 ± 0.46	0.14 ± 0.10	0.21 ± 0.36	0.10 ± 0.05
GPx (U mg ⁻¹ prot)	1.00 ± 2.34	0.64 ± 1.17	0.95 ± 2.02	0.33 ± 0.280
SOD (U mg ⁻¹ prot)	652.4 ± 468	882 ± 550	784.9 ± 566.7	764 ± 374.9
GSH (nmol mg ⁻¹ de prot)	33.87 ± 21.97	40.55 ± 47.9	40.52 ± 43.	28.49 ± 15.7

TBARS=sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Prot. Carb= carbonilos proteicos, GR=glutación reductasa, CAT=catalasa, GST=glutación-S-transferasa, GPx=glutación peroxidasa, SOD=superóxido dismutasa, GHS=glutación. Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar. Menor consumo = nunca o al menos una vez por mes, Mayor consumo = una vez cada dos semanas o más de una vez por semana.

Anexo 6. Análisis de regresión lineal que evalúa la relación entre los indicadores de daño oxidativo (TBARS=sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Prot. Carb.=carbonilos proteicos) y las defensas antioxidantes (GR=glutación reductasa, CAT= catalasa, GST=glutación-S-transferasa, GPx=glutación peroxidasa, SOD=superóxido dismutasa, GSH=glutación) de acuerdo al consumo de pescado.

		TBARS				Proteínas Carboniladas			
		r	p	IC al 95%		r	p	IC al 95%	
				Val. Inf.	Val. Sup.			Val. Inf.	Val. Sup.
GR	menor	0.264	0.262	-250.57	72.386	0.179	0.45	-10.927	5.053
	mayor	0.121	0.566	-45.309	80.803	0.141	0.502	-9.301	4.687
CAT	menor	0.105	0.66	-3.157	2.049	0.226	0.339	-0.182	0.066
	mayor	0.019	0.927	-3.481	3.81	0.121	0.563	-0.517	0.288
GST	menor	0.019	0.937	-358.801	332.211	0.135	0.572	-21.168	12.057
	mayor	0.435	0.030*	96.993	1704.491	0.277	0.18	-159.227	31.563
GPx	menor	0.078	0.745	-77.823	56.702	0.171	0.471	-4.356	2.094
	mayor	0.345	0.091	-10.812	136.407	0.248	0.232	-13.467	3.436
SOD	menor	0.589	0.006*	0.129	0.676	0.068	0.776	-0.014	0.019
	mayor	0.506	0.010*	0.052	0.34	0.149	0.477	-0.025	0.012
GSH	menor	0.241	0.306	-10.488	3.483	0.207	0.382	-0.196	0.487
	mayor	0.277	0.18	-3.074	0.611	0.238	0.268	-0.326	0.095

Menor consumo = nunca o al menos una vez por mes, n = 20. Mayor consumo = una vez cada dos semanas o más de una vez por semana, n= 25. Val. Inf. = Valor inferior de un intervalo de confianza. Val. Sup. = Valor superior de un intervalo de confianza. * p < 0.05.

Anexo 7. Análisis de regresión lineal que evalúa la relación entre los indicadores de daño oxidativo (TBARS=sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, Prot. Carb.= carbonilos proteicos) y las defensas antioxidantes (GR=glutación reductasa, CAT= catalasa, GST=glutación-S-transferasa, GPx=glutación peroxidasa, SOD=superóxido dismutasa, GSH=glutación) de acuerdo al consumo de mariscos.

		TBARS				Proteínas Carboniladas			
		r	p	IC al 95%		r	p	IC al 95%	
				Val. Inf.	Val. Sup.			Val. Inf.	Val. Sup.
GR	menor	0.06	0.735	-85.528	60.991	0.15	0.397	-5.722	2.329
	mayor	0.036	0.915	-653.245	719.479	0.142	0.678	-93.334	136.985
CAT	menor	0.115	0.519	-2.751	1.417	0.134	0.449	-0.159	0.072
	mayor	0.277	0.409	-5.514	12.352	0.016	0.962	-1.609	1.54
GST	menor	0.031	0.863	-265.235	314.568	0.125	0.483	-21.53	10.402
	mayor	0.03	0.93	-2357.841	2554.646	0.293	0.382	-559.613	236.324
GPx	menor	0.412	0.817	-45.382	57.123	0.174	0.324	-4.179	1.426
	mayor	0.448	0.168	-646.348	130.73	0.467	0.147	-110.664	19.446
SOD	menor	0.593	0.0002 *	0.154	0.449	0.001	0.996	-0.01	0.01
	mayor	0.128	0.707	-0.377	0.267	0.88	0.797	-0.061	0.048
GSH	menor	0.256	0.144	-4.042	0.616	0.111	0.532	-0.174	0.092
	mayor	0.022	0.938	-8.003	7.545	0.062	0.856	-1.206	1.423

Menor consumo = nunca o al menos una vez por mes, n = 20. Mayor consumo = una vez cada dos semanas o más de una vez por semana, n= 25. Val. Inf. = Valor inferior de un intervalo de confianza. Val. Sup. = Valor superior de un intervalo de confianza. * p < 0.05.

