

# Comportamiento del óxido nítrico y del malondialdehído en la leche materna de mujeres con sobrepeso y obesidad

## *Behavior of nitric oxide and malondialdehyde in breast milk of women with overweight and obesity*

Barrios Olivero Eduardo<sup>1</sup>, Chávez Hernández Mervin<sup>1</sup>, Rodríguez Villalobos Alberto<sup>1</sup>, Chávez Castillo Mervin<sup>2</sup>, González González Carmen<sup>2</sup>, Medina Reyes Mayerlim<sup>2</sup>, Souki Rincón Aida<sup>2</sup>, Vargas de Hernández María<sup>2</sup>, López Azuaje Ealys<sup>3</sup>, Bohórquez Prieto Lissette<sup>3</sup>, Cano Ponce Climaco<sup>2</sup>.

<sup>1</sup>Hospital de Niños de Maracaibo, Especialidad en Pediatría, División de Postgrado, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez", Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

<sup>3</sup>Escuela de Nutrición y Dietética, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia, Maracaibo, Estado Zulia, Venezuela.

Recibido: 20/05/2012

Aceptado: 20/08/2012

## Resumen

El objetivo de esta investigación fue determinar las concentraciones de Óxido Nítrico (NO) y Malondialdehído (MDA) así como la relación antioxidación/oxidación representada por el índice NO/MDA de la leche materna de mujeres con sobrepeso u obesidad. Se realizó un estudio descriptivo, comparativo y transversal entre madres lactantes eutróficas Grupo A (n=39) y con sobrepeso u obesidad Grupo B (n=39) hospitalizadas con sus hijos en los servicios de Hospitalización del Hospital de Niños de Maracaibo. Se extrajeron y procesaron 78 muestras de leche materna entre Noviembre 2011-2012. Se compararon las concentraciones de MDA:  $1,18 \pm 0,06 \mu\text{M}$  en A y  $1,08 \pm 0,05 \mu\text{M}$  en B, las concentraciones de NO:  $589,65 \pm 48,02 \mu\text{M}$  en A y  $659,74 \pm 78,60 \mu\text{M}$  en B; y el índice NO/MDA:  $558,45 \pm 52,42$  en A y de  $705,19 \pm 108,27$  en B, no se observaron diferencias significativas para ninguno de los parámetros estudiados entre ambos grupos. En conclusión los resultados obtenidos sugieren que el estado nutricional de las mujeres lactantes estudiadas no modificó los niveles de oxidación en la leche materna y que el aumento del contenido graso corporal parece no influir en mayores niveles de oxidación. En ambos grupos se observaron niveles de NO elevados y también una relación NO/MDA positiva, resultados que parecen indicar la existencia de mecanismos fisiológicos en la glándula mamaria que tienden a mantener en estado "normal" una sustancia como la leche materna, la cual contribuye a la protección de la agresión por radicales libres al recién nacido y en etapas posteriores.

**Palabras clave:** Oxido Nítrico, Malondialdehído, Leche Materna, Sistema Antioxidante, Nutrición Materna.

## Abstract

The aim of this research was to determine the concentrations of nitric oxide (NO) and Malondialdehyde (MDA) and to evaluate the antioxidation/oxidation relation represented by the NO/MDA index of women breast milk, which are overweight or obese. We performed a descriptive, comparative and transversal study between lactating eutrophic group A (n=39) and overweight or obese mothers group B (n=39), hospitalized with their children in inpatient services at Children's Hospital of Maracaibo. 78 samples of breast milk were extracted and processed from November 2011 to 2012. Concentrations of MDA  $1.18 \pm 0.06 \mu\text{M}$  in A and  $1.08 \pm 0.05 \mu\text{M}$  in B, levels of NO:  $589.65 \pm 48.02 \mu\text{M}$  in A and  $659.74 \pm 78.60 \mu\text{M}$  in B; as well NO/MDA index:  $558.45 \pm 52.42$  in A and  $705.19 \pm 108.27$  in B were compared. Significant differences were not observed for any of these studied parameters between groups. In conclusion the results suggest that the nutritional status of lactating women studied, did not modify the oxidation levels in breast milk and that increased body fat appears not to have influence on higher levels of oxidation. In both groups there were high levels of NO and NO/MDA positive relation, results that suggest the existence of physiological mechanisms in the mammary gland that tend to maintain in "normal" a substance like milk, which contributes to the newborn protection from free radical aggression and in later stages.

**Key words:** Nitric Oxide, Malondialdehyde, Breast Milk, Antioxidant system, Maternal Nutrition

# Introducción

La leche materna constituye el alimento natural e ideal para niñas y niños, recién nacidos y lactantes, administrada de forma exclusiva y a libre demanda durante los primeros 6 meses de vida, y luego de esta edad, complementado con alimentos adecuados, oportunos y seguros <sup>(1)</sup>.

El recién nacido y el lactante presentan inmadurez de numerosas vías metabólicas y funciones fisiológicas <sup>(2,3)</sup>, lo que hace a la leche materna un alimento imprescindible que aporta una defensa adicional frente al desarrollo de diversas patologías. Entre estas enfermedades se encuentran las agrupadas bajo el término de enfermedades neonatales por radicales libres de oxígeno, de mayor incidencia en recién nacidos pretérminos, tales como: la displasia broncopulmonar, la enterocolitis necrotizante y la retinopatía del prematuro <sup>(4,5)</sup>.

La madre ayuda en un principio al feto a protegerse de la agresión oxidativa que sufrirá en el momento del parto mediante el paso a través de la placenta de sustancias antioxidantes tales como ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -carotenos y coenzima Q <sup>(6)</sup>, y posteriormente al recién nacido mediante el aporte de sustancias antioxidantes a través de la leche materna <sup>(7)</sup>.

La leche materna parece adaptar su composición dependiendo del grado de estrés oxidativo existente en el recién nacido, mostrando unos mayores niveles de vitaminas antioxidantes A, E y C en la leche secretada horas después del parto, es decir; el calostro <sup>(8)</sup>, coincidiendo con los mayores niveles de radicales libres de oxígeno (RLO) en el medio interno fetal <sup>(9)</sup>. Posteriormente se van reduciendo estas concentraciones a lo largo de diversas etapas de la lactación (leche de transición y leche madura) lo cual coincide con el descenso de los RLO <sup>(10)</sup>.

En la composición de la leche materna se pretende alcanzar el equilibrio entre factores pro-oxidantes y factores anti-oxidantes. Los factores anti-oxidantes tales como el  $\alpha$ -tocoferol, coenzima Q, el ácido ascórbico, el retinol, algunas proteínas como caseínas y lactoferrinas y el óxido nítrico (NO), tienen efectos involucrados con la reducción del estrés oxidativo; mientras que los factores pro-oxidantes aumentan la peroxidación lipídica por acción directa sobre los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana celular y organelos celulares, liberación de RLO y formación de productos de carácter tóxico como el malondialdehído (MDA), particularmente en los neonatos y lactantes, con el consecuente incremento del estrés oxidativo <sup>(11)</sup>.

Las madres obesas, producto de una dieta inadecuada en exceso o un trastorno endocrino, tienen afectada la

calidad y la composición de la leche materna que producen, pudiendo verse aumentadas las reservas calóricas que son acumuladas en el cuerpo en forma de grasas lo cual obviamente tiene implicaciones en la generación de mayor radicales libres de oxígeno a través de la peroxidación lipídica tanto para la gestante como para el lactante <sup>(11,12)</sup>. Se ha demostrado que el aumento del índice de masa corporal (IMC) de 21 a 27 kg/m<sup>2</sup> incidió en el incremento de la concentración de lípidos totales de 3,9 a 4,21% en la leche materna de mujeres danesas <sup>(13)</sup>.

De igual forma otro estudio con madres con estado nutricional normal, con sobrepeso y obesas, demostró que las concentraciones de lípidos y ácido linoléico estuvieron incrementadas en las madres obesas <sup>(14)</sup>. Sin embargo, otras investigaciones demuestran que no existe relación entre la ganancia de peso de las madres posterior al parto, con el contenido de grasas de la leche materna ya que las múltiples fuentes de ácidos grasos permiten minimizar las variaciones de la dieta y mantener la cantidad absoluta de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga relativamente constante <sup>(12,15)</sup>.

Por lo anteriormente expuesto y con la finalidad de conocer el comportamiento de variables como el MDA y NO en leche materna, se planteo como objetivo de esta investigación determinar sus concentraciones y la relación antioxidación/oxidación representada por el índice NO/MDA de la leche materna de mujeres con sobrepeso u obesidad.

## Métodos

Se realizó un estudio descriptivo, comparativo y transversal en madres lactantes ingresadas con sus hijos en los Servicios de Hospitalización del Hospital de Niños de Maracaibo, desde noviembre de 2011 hasta noviembre de 2012. La muestra no probabilística, quedo conformada por 78 madres lactantes, con edades comprendida entre 18 y 40 años, no alcohólicas ni fumadoras, con hijos nacidos por parto vaginal o cesárea, independientemente de la edad gestacional, lactantes de 1 a 24 meses de edad al momento del estudio, alimentados con leche materna y con diagnóstico de sepsis, bronquiolitis, diarrea o neumonía. La muestra fue clasificada en 2 categorías:

**Grupo A:** 39 madres eutróficas, con índice de masa corporal (IMC) entre 18,5 Kg/m<sup>2</sup> y 24,9 Kg/m<sup>2</sup>, circunferencia braquial <sup>3</sup> 24cm, y grasa corporal total entre 21% y 31%.

**Grupo B:** 39 madres con sobrepeso u obesidad, con IMC > 24,9 Kg/m<sup>2</sup>, circunferencia braquial <sup>3</sup> 24cm y grasa corporal total > 31%.

La información fue recogida en un formato diseñado por los autores, previo consentimiento informado de las madres. La toma de muestra de leche materna se realizó previo ayuno de 12 horas de la madre, por extracción manual entre 1 a 24 meses de la lactancia, durante el amamantamiento del mismo pecho, al final de la mamada (fase de emulsión), obteniéndose 5cc los cuales fueron almacenadas en tubos Vacutainer® y mezclados con cuidado y suavemente. Adicionalmente, las muestras se mantuvieron en todo momento congeladas y protegidas de la exposición solar y llevadas de forma inmediata al Centro de Investigaciones Endocrino-Metabólicas "Dr. Félix Gómez" de la Facultad de Medicina de la Universidad del Zulia, donde las muestras fueron ultra-congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  y procesadas en un período menor de 12 horas posteriores a su extracción para la determinación de la concentración de MDA, NO e Índice NO/MDA.

La determinación de MDA se realizó a través de la formación de derivados del ácido tiobarbitúrico, que sigue los siguientes pasos: precipitación de las proteínas séricas, liberación de MDA unido a las proteínas, reacción con el ácido tiobarbitúrico, determinación de los complejos MDA-ácido tiobarbitúrico por análisis espectrofotométrico y, finalmente, eliminación de interferencia de otros aldehídos, como el furfuraldehído, para el cálculo final <sup>(15,16)</sup>.

La determinación del NO se efectuó a través de su producto de degradación: los nitritos, por medio del ensayo de diazotización (reacción de Greiss) previa reducción de los nitratos. Las muestras se homogenizaron con ácido clorhídrico, se centrifugaron a 6000g durante 10 minutos con ácido sulfanílico, se les añadió a continuación N-1-naftil-etilendiamina y se incubaron durante 30 minutos más. La muestra completa fue tomada y la absorbancia fue medida en un espectrofotómetro Génesis 5 contra estándar <sup>(17,18)</sup>. El Índice NO/MDA se obtuvo al dividir el valor de NO entre el valor de MDA de cada muestra.

#### Análisis Estadístico.

El análisis de los resultados fue realizado utilizando el paquete estadístico SPSS versión 17 para Windows (Chicago IL). Para comparar los grupos, fue aplicada la prueba t de Student para muestras independientes. Los resultados fueron expresados como Media  $\pm$  Error Estándar (M  $\pm$  EE) considerando significativas las diferencias cuando  $p < 0,05$ .

## Resultados

La Tabla 1, muestra la edad promedio de las madres lactantes, en el grupo A (madres eutróficas) fue de  $23,66 \pm 0,76$  años y en el B (madres con sobrepeso u obesas) de  $27,10 \pm 0,63$  años. La media de peso, talla e IMC fue de  $55,13 \pm 1,15$  Kg;  $1,57 \pm 0,01$  m y  $22,29 \pm 0,32$  Kg/m<sup>2</sup> respectivamente para las madres del grupo A y de  $73,86 \pm 2,13$  Kg;  $1,55 \pm 0,01$  m y  $30,50 \pm 0,70$  Kg/m<sup>2</sup> para el B. Por otra parte, para el grupo A se observó un porcentaje de grasa corporal total de  $27,86 \pm 0,50\%$  y una circunferencia braquial de  $26,62 \pm 0,36$ cm, mientras que para el B fue de  $43,82 \pm 1,23\%$  y  $32,06 \pm 0,65$ cm respectivamente, encontrándose diferencias estadísticamente significativas con respecto al peso, el IMC, la grasa corporal total y la circunferencia del brazo ( $p < 0,05$ ).

En la Figura 1, se observan los niveles de MDA determinados en las muestras de leche materna, el cual para las madres eutróficas fue de  $1,18 \pm 0,06$   $\mu\text{M}$  y de  $1,08 \pm 0,05$   $\mu\text{M}$  para las madres lactantes con sobrepeso u obesas, lo cual no muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,233$ ).

En la Figura 2, se observan los niveles de NO determinados en las muestras de leche materna, el cual para las madres eutróficas fue de  $589,65 \pm 42,02$   $\mu\text{M}$  y de  $659,74 \pm 78,60$   $\mu\text{M}$  para las madres lactantes con sobrepeso u obesas, lo cual no muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,449$ ).

En la Figura 3, se observa la relación antioxidación/oxidación expresadas por el índice NO/MDA determinado en las muestras de leche materna, el cual para las madres eutróficas fue de  $558,45 \pm 52,42$  y de  $705,19 \pm 108,27$  para las madres lactantes con sobrepeso u obesas, lo cual no muestra diferencias estadísticamente significativas ( $p=0,226$ ).

Tabla 1. Características antropométricas de las madres lactantes eutróficas y obesas.

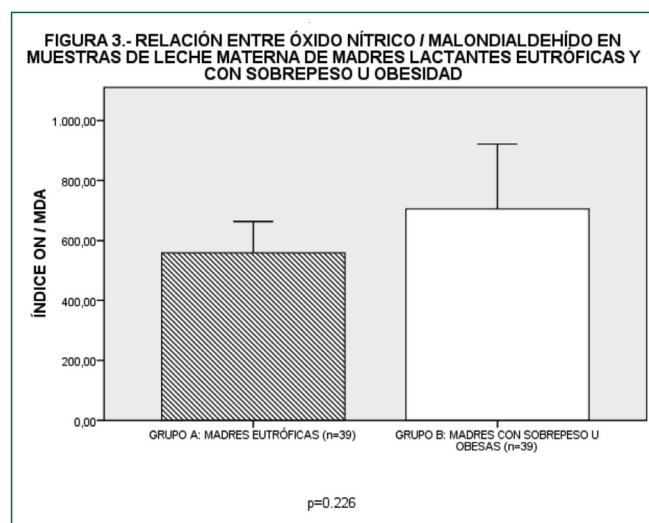
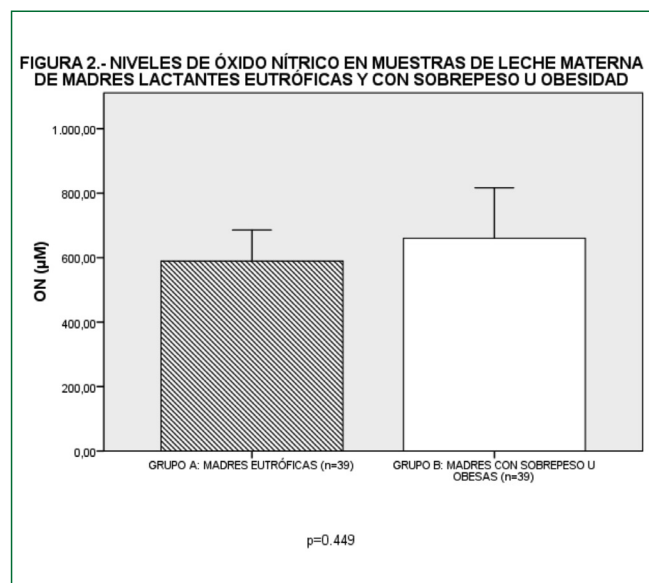
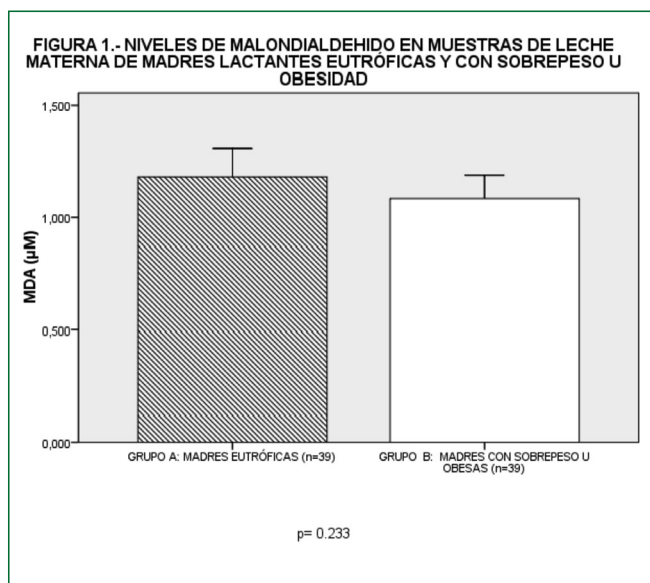
	Grupo A (n=39)	Grupo B (n=39)	p
Edad (años)	$23,66 \pm 0,76$	$27,10 \pm 0,63$	0.001*
Peso (kg.)	$55,13 \pm 1,15$	$73,86 \pm 2,13$	<0.0001*
Talla (m.)	$1,57 \pm 0,01$	$1,55 \pm 0,01$	0.203
IMC (kg/m <sup>2</sup> .)	$22,29 \pm 0,32$	$30,50 \pm 0,70$	<0.0001*
Grasa corporal total (%)	$27,86 \pm 0,50$	$43,82 \pm 1,23$	<0.0001*
Circunferencia de brazo (cm)	$26,62 \pm 0,36$	$32,06 \pm 0,65$	<0.0001*

Datos expresados como Media  $\pm$  Error Estándar (EE)

IMC= Índice de Masa Corporal.

Grupo A= Eutróficas, Grupo B=Sobrepeso y Obesas.

\* =  $p < 0.05$ .



## Discusión

La leche materna representa un sistema fluido, vivo y cambiante, capaz de adaptarse a las necesidades del niño a lo largo del tiempo, aportando diferente composición y volumen de micro y macronutrientes, anticuerpos, hormonas, factores inmunitarios, oxidantes y antioxidantes <sup>(2)</sup>.

En esta investigación las muestras que conforman a cada grupo son idénticas y de igual modo las madres lactantes eutróficas y con sobrepeso u obesas fueron en su totalidad no alcohólicas, ni fumadoras, similar a las características de las madres lactantes reportadas por Miranda y cols. <sup>(12)</sup> y Rodríguez <sup>(4)</sup>, aunque dichos trabajos no consideraron el estado nutricional como variable de estudio.

En cuanto al peso y en concordancia con los criterios de inclusión, las madres del grupo A presentaron un peso menor, comparado con el grupo de madres con sobrepeso u obesas, existiendo diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0,0001$ ); diferencia que no fue observada para la talla ( $p = 0,203$ ). El IMC, medida práctica más utilizada para determinar el grado de obesidad materna, permitió clasificar al grupo B como sobrepeso u obesas con un IMC mayor que el grupo A, diferencia que resultó estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). De igual forma, la circunferencia braquial ( $p < 0,0001$ ) y el porcentaje de grasa corporal ( $p < 0,0001$ ), confirmaron el exceso de reserva corporal grasa presente en el grupo B en comparación con el grupo de madres eutróficas.

Los RLO se han asociado con daño a moléculas como lípidos, proteínas, ácidos nucleídos y carbohidratos, participan en la peroxidación de lípidos de las membranas celulares y demás orgánulos, inactivan la producción de ON, entre otros <sup>(13)</sup>. En la leche materna la oxidación de

los lípidos, origina productos de reacción que contribuyen a la formación de radicales y derivados reactivos de oxígeno, que parece pueden favorecer el desarrollo de algunas patologías como la enterocolitis necrotizante o la displasia broncopulmonar <sup>(5)</sup>.

La determinación de la concentración de MDA como evaluador del estrés oxidativo de la leche materna, se justifica no solo por su interés como indicador del proceso de peroxidación lipídica, del que es producto directo, sino también por el riesgo que supone en sí mismo dado su carácter tóxico <sup>(5)</sup>. En este estudio, los resultados obtenidos han comprobado la existencia de niveles bajos de MDA en todas las muestras de leche materna fresca analizadas, con baja variabilidad entre los grupos de madres eutróficas y madres con sobrepeso u obesas ( $p = 0,233$ ), posible consecuencia de la selección de las donantes entre madres lactantes, no alcohólicas y no fumadoras, a pesar de que en este estudio se consideró la modificación en el estado nutricional materno el cual no influyó en determinar mayores niveles de oxidación como se pudo



haber esperado por el aumento del contenido graso en la leche materna de madres con sobrepeso u obesas en comparación con la de madres eutróficas, que si bien no fue evaluado en la presente investigación ha sido reportado por otros autores <sup>(13,14)</sup>.

En esta investigación, el contenido de MDA en la leche materna fresca esta en el rango fisiológico en ambos grupos y es similar a los resultados de los estudios de Turoli y Miranda y cols., aunque según estos autores el tiempo de almacenamiento, conlleva a un incremento suave en las primeras 24 horas, a partir de las cuales la concentración de MDA muestra un marcado aumento con diferencia estadística significativa, así a las 36 horas de almacenamiento la concentración de MDA es significativamente mayor, pero sin modificaciones posteriores. <sup>(5,12)</sup>

En este estudio, los niveles de NO en las muestras de leche materna en ambos grupos están elevados y los de MDA son bajos (en el rango normal), lo cual es un reflejo directo del bajo nivel oxidativo que existe en la leche materna de madres tanto con sobrepeso u obesidad como eutróficas, por lo que la inactivación de la producción del ON local es mínima, resultando en un balance antioxidación/oxidación positivo. El sistema antioxidante de la leche materna se está comportando como un excelente amortiguador defendiéndose de la generación de RLO. Este contenido de NO en la leche materna fresca elevado en ambos grupos, es un aspecto no estudiado con anterioridad, lo cual puede ser el resultado de una superestimulación de la *óxido nítrico* sintetasa inducible (iNOS), la cual sin lugar a duda, tiene un efecto benéfico-defensivo. <sup>(4-19)</sup>

Por otra parte, Zaragoza y cols <sup>(19)</sup> han determinado en la glándula mamaria de ratas lactantes mediante inmunohistoquímica la presencia de las tres isoformas de NOS (enzima que cataliza la producción de NO a partir de la oxidación secuencial de L-arginina), localizándose eNOS en el endotelio de los vasos sanguíneos que riegan el tejido mamario y en el endotelio de los conductos lactíferos, además tanto eNOS como iNOS están presentes en la membrana basal del epitelio mamario (compuesta de células mioepiteliales que forman los alvéolos y los conductos lactíferos) y nNOS se encuentra en las células que componen los acinos así como en las células musculares y las células que conforman las glándulas sebáceas. Si bien, el papel fisiológico de la producción de NO en este tejido no está determinado, podría tener un rol importante en la secreción de la leche materna en la glándula mamaria. <sup>(20)</sup>

Se ha sugerido en los estudios de Ilzuka y cols y de Ohta y cols, que el NO es sintetizado en la glándula mamaria, excediendo la concentración sérica de NO de dos a diez

veces y puede provocar la lactancia en humanos, ya que la concentración total de nitritos más nitratos (marcador de la generación de NO) aumento y alcanzo su punto máximo justo antes del aumento en el volumen de la leche materna secretada; así mismo la concentración total de nitritos mas nitratos en la leche materna de grandes secretoras excede significativamente a la de bajas secretoras, en nuestra investigación las muestras de leche materna fueron tomadas de las madres donantes en fase de emulsión, es decir; de 10-15 minutos desde el inicio del amamantamiento lo cual pudo influir en los altos niveles de ON en ambos grupos pero sin diferencia significativa entre ambos (p=0,449). <sup>(20,21)</sup>

En este estudio, se observó que la relación entre NO/MDA, que podría ser utilizada como expresión del balance antioxidación/oxidación, está claramente a favor de la antioxidación, tanto en el grupo de madres eutróficas como en el grupo de madres con sobrepeso u obesas, definido como balance positivo y sin diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (p=0,226). Este parámetro no ha sido evaluado en estudios anteriores como el de Miranda y col y el de Rodríguez quienes complementaron su evaluación con la medición de la capacidad antioxidante total de la leche materna, la cual es la medida de todos los antioxidantes presente en ella, tales como: vitaminas, sistemas antioxidantes de radicales enzimáticos, antioxidantes desconocidos y las interacciones antioxidantes, siendo un marcador sensible que permite detectar pequeñas diferencias mucho mejor que las mediciones de los antioxidantes por separado. <sup>(12,4)</sup>

El estudio de Rodríguez, encuentra diferencias estadísticamente significativas durante las primeras etapas de la lactación entre el grupo a término y el pretérmino. Dicho estudio encontró, que es la leche materna de madres con parto a término la que tiene mayor capacidad antioxidante total en el calostro y leche de transición, pasando a ser similar en la etapa madura. El estudio de Miranda y col obtuvo una gran variabilidad de la capacidad antioxidante entre las madres donantes similar al resultado que se obtuvo en esta investigación con el índice NO/MDA. <sup>(4,12)</sup>

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren que el estado nutricional de las mujeres lactantes estudiadas no modifico los niveles de oxidación en la leche materna y que el aumento del contenido graso corporal parece no influir en mayores niveles de oxidación. En ambos grupos se observaron niveles de NO elevados y también una relación NO/MDA positiva, resultados que parecen indicar la existencia de mecanismos fisiológicos que tienden a mantener en estado normal una sustancia como la leche materna, la cual contribuye a la protección de la agresión por radicales libres al recién nacido y en etapas poste-

rios y que en caso contrario se convertiría en un factor causante de diferentes patologías.

## Referencias

1. Salazar S, Chávez M, Delgado X, Pacheco T, Rubio E. Lactancia materna. Arch Venez Puer Ped. 2009. 72 (4):163-166.
2. Biesalski H, Grimm P. Nutrición Texto y Atlas. Caracas: Médica Panamericana. 2008.
3. Delgado X, Salazar S. Lactancia materna: beneficios científicos demostrados. Caracas: Médica Panamericana, Nutrición Pediátrica. Arch Venez Puer Ped. 2009. 83-98.
4. Rodríguez G. Estudio del contenido en antioxidantes (coenzima Q, tocoferol, retinol, ácido ascórbico y ácido úrico), minerales y perfil lipídico en leche humana en distintas etapas de su maduración: diferencias entre leches de madres con parto a término y madres con parto prematuro. [Tesis en línea]. Universidad de Granada, España. 2009. Consultada el 19 de marzo de 2011 en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/2586/1/18323054.pdf>
5. Tuoli D, Testolin G, Zanini R, Bellú R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. Acta Paediatr. 2004. 93(12):1569-1574
6. Askie L, Henderson D, Irwig L, Simpson J. Oxygen-saturation targets and outcomes in extremely preterm infants. N Engl J Med. 2003. 349(10):959-967.
7. Aw T, Andersson B, Kennedy F, Jones D. Intracellular O<sub>2</sub> supply to support mitochondrial generation of hydrogen peroxide: General properties and effects of hyperbaric oxygen. Biochem J. 1996. 143 (21): 707-716.
8. Hong J, Park E, Kim Y, Lee H, Park B. Association of antioxidant vitamins and oxidative stress levels in pregnancy with infant growth during the first year of life. Public Health Nutrition. 2007. 11(10):998-1005.
9. Howlader M, Parveen S, Tamanna S, Khan T, Begum F. Oxidative stress and antioxidant status in neonates born to pre-eclamptic mother. Trop Pediatr. 2009. 55(6): 363-367.
10. Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, Garcia F, Vina J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. J Pediatr. 2003. 142: 240-246.
11. Sharda B. Free radicals: emerging challenge in environmental health research in childhood and neonatal disorders. Int J Environ Res Public Health. 2006. 3 (3): 286-291.
12. Miranda M, Gormaz M, Romero F, Silvestre D. Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal. Nutr Hosp. 2011. 26 (4): 722-728.
13. Jensen R. Lipids in Human milk. Lipids. 1995. 34: 1243-1271
14. Marín M, Sanjurj A, Rodrigo M, de Alaniz M. Long-chain polyunsaturated fatty acids in breast milk in La Plata, Argentina: relationship with maternal nutritional status. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 2005. 73(5):355-60
15. Bermúdez V, Bracho V, Bermúdez F, Medina M, Nuñez M, Amell A, Cano C. Comportamiento del malondialdehído y óxido nítrico séricos en pacientes con infarto de miocardio. Rev Esp Cardiol. 2000. 53 (4): 502-506.
16. Draper H, Squires E, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M. Comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. Free Radic Biol Med. 1993. 15: 353-363.
17. Sosa B, Cammarata R, Pacheco B, Armas M, Armas M, Guerrero J, Carvajal A, Hernández R. Oxido nítrico y malondialdehído en sujetos normotensos e hipertensos. Boletín Médico de Postgrado UCLA [Revista en línea]. 2004. 20 (4). Consultada el 4 de junio de 2012 en: [http://bibmed.ucla.edu/ve/DB/psm\\_ucla/edocs/BM2004/BM200413.pdf](http://bibmed.ucla.edu/ve/DB/psm_ucla/edocs/BM2004/BM200413.pdf)
18. Archer S. Measurement of nitric oxide in biological models. FASEB J. 1993. 7: 349-360.
19. Zaragoza R. Cambios en la expresión de los genes involucrados en el ciclo celular y apoptosis durante el destete en la glándula mamaria de rata lactante. Papel del GSH. [Tesis en línea]. Universidad de Valencia, España. 2004. Consultada el 5 de noviembre de 2011 en: <http://es.scribd.com/doc/42768188/57/PAPEL-DEL-OXIDO-NITRICO>
20. Ilzuka T, Sasaki M, Oishi K, Uemura S, Koike M, Minatogawa Y. Nitric oxide may trigger lactation in humans. J Pediatr. 1997. 131 (6), 839-843.
21. Ohta N, Tsukahara H, Ohshima Y, Nishii M, Ogawa Y, Sekine K, Kasuga K, Mayumi M. Nitric oxide metabolites and adrenomedullin in human breast milk. Early Human Development. 2004. 78: 61-65.