

REVISIÓN

Efecto de la conservación de la leche humana sobre su actividad antioxidante

E.J. Jareño Roglán¹, M. Gormaz Moreno², D. Silvestre Castelló³

¹Centro de Salud de Moncada (Valencia). ²Servicio de Neonatología y Banco de Leche. Hospital Universitario «La Fe». Valencia. ³Departamento de Farmacia. Universidad CEU-Cardenal Herrera. Moncada (Valencia)

Resumen

En ocasiones, es necesaria la extracción y almacenamiento de la leche materna en refrigeración o congelación, con frecuencia relacionado con recién nacidos pretérmino (RNPT) o madres que se incorporan al trabajo. Se recomienda administrarla recién extraída, refrigerada durante un máximo de 72-96 horas, o congelada un máximo de 6 meses. El estrés oxidativo es un desequilibrio entre los agentes oxidantes y las defensas antioxidantes; está directamente implicado en diversas patologías propias del RNPT, como la retinopatía de la prematuridad, la displasia broncopulmonar, la enterocolitis necrosante o la encefalopatía hipóxico-isquémica. La leche materna es rica en sustancias antioxidantes, y presenta una mayor actividad antioxidante que las fórmulas artificiales. Esta riqueza es mayor en el colostro, y a menor edad gestacional.

Diversos estudios han demostrado que el almacenamiento de la leche humana puede alterar sus propiedades antioxidantes. Se produce un incremento significativo de los productos de la peroxidación de los lípidos (malondialdehído [MDA]) y una disminución de la actividad de la enzima antioxidante glutatión peroxidasa (GPx) con la refrigeración y, en menor grado, con la congelación. El incremento del MDA y el descenso de la actividad GPx es proporcional a la duración de la congelación, y mayor a -20 que a -80 °C. Incluso en congelación, la concentración de MDA en la leche materna es significativamente menor que en las fórmulas artificiales.

Concluimos que la conservación en frío de la leche materna disminuye sus propiedades antioxidantes, en mayor medida durante almacenamientos prolongados y a temperaturas más altas. Por ello, en el caso de la leche materna almacenada para los recién nacidos enfermos o prematuros, es preferible congelar que refrigerar, y es mejor hacerlo durante el menor tiempo y a las más bajas temperaturas posibles. En el caso de las madres que se incorporan al trabajo, esta recomendación es más relativa (lactantes más maduros). Aun así, pese a las pérdidas por el almacenamiento, la leche materna sigue siendo de mejor calidad que los sucedáneos.

©2014 Ediciones Mayo, S.A. Todos los derechos reservados.

Palabras clave

Leche materna, almacenamiento, recién nacido pretérmino, estrés oxidativo, actividad antioxidante, malondialdehído, glutatión peroxidasa

Abstract

Title: Effect of human milk storage on their antioxidant activity.

Sometimes the extraction and storage of breast milk in refrigerator or freezer is required, frequently associated with preterm newborn or mothers returning to work. It is suggested to offer the milk freshly drawn, refrigerated for up to 72-96 hours, or frozen up to 6 months. Oxidative stress is defined as a disturbance between oxidant agents and antioxidant defences. Oxidative stress is directly involved in various pathologies of preterm infants, such as retinopathy of prematurity, bronchopulmonary dysplasia, necrotizing enterocolitis or hypoxic-ischemic encephalopathy. Breast milk has a large amount of antioxidants and has better antioxidant properties than formula for bottle-feeding. This amount is greater in colostrum, and greater as gestational age decreases.

Several studies have shown that human milk storage can damage their antioxidant properties. A significant increase in the products of peroxidation of lipids (malondialdehyde [MDA]) and a decrease in the antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) activity is observed with refrigeration and, to a lesser degree, with freezing. Increase of MDA levels and decrease in GPx activity is proportional to the duration of freezing, and greater at -20 than -80 °C. Even in freezing, MDA concentration of breast milk is significantly lower than in formula for bottle-feeding.

We conclude that cold storage of breast milk decreases its antioxidant properties, mostly during extended storage and at higher temperatures. Therefore, when breast milk is stored for sick or premature newborns, it is preferable to freeze than refrigerate, and it is better in the shortest possible time and at the lowest possible temperatures. For mothers who return to work, this recommendation is not so strong (they are more mature infants). Anyway, despite effects of storage, breast milk is still better quality than substitutes.

©2014 Ediciones Mayo, S.A. All rights reserved.

Keywords

Breast milk, storage, preterm infant, oxidative stress, antioxidant activity, malondialdehyde, glutathione peroxidase

Extracción y almacenamiento de leche materna

La nutrición óptima de los recién nacidos a término (RNT) y pretérmino (RNPT) es la lactancia materna, por sus beneficios sobre la salud a corto y largo plazo. Cuando la leche de madre propia no está disponible, la mejor alternativa para RNPT es la leche humana donada pasteurizada, proporcionada por un banco de leche. Así lo reconocen la Organización Mundial de la Salud¹ y la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátricas (ESPGHAN)². Los máximos beneficios se obtienen con el amamantamiento directamente al pecho; sin embargo, no siempre es posible.

En los casos en que el bebé no puede tomar la leche materna directamente mediante succión del pecho, por diversas causas (prematuridad, enfermedades neurológicas, determinados problemas orofaciales), es recomendable recurrir a la extracción de la leche y su administración por otros métodos (sonda, biberón, cuchara), generalmente de forma temporal³.

Puede haber otros motivos por los que se realice la extracción y posterior almacenamiento de leche materna: mantener la producción de leche cuando no hay succión directa frecuente (generalmente por los problemas ya mencionados), aliviar la ingurgitación mamaria si no hay suficiente vaciado, ausencias maternas aisladas, incorporación de la madre al trabajo, o donación altruista de leche para bancos de leche humana.

Los motivos más frecuentes son que los recién nacidos no pueden succionar (más habitual en grandes prematuros) y la incorporación de la madre al trabajo.

Una vez extraída la leche materna, puede ofrecerse al lactante en fresco a temperatura ambiente, inmediatamente o poco tiempo después de su extracción (no más de 4-6 h; si se excede este tiempo, se recomienda refrigerarla)^{3,4}. La leche puede conservarse durante cortos periodos refrigerada en la nevera a 4-6 °C (72 h; algunos autores postulan hasta 96 h)^{3,6}, o bien tras ser congelada (hasta 6 meses)^{3,5}. La congelación es posible a -20 °C (en congeladores habituales tanto de uso doméstico como en hospitales o en la mayoría de bancos de leche humana), o bien a -80 °C.

Estrés oxidativo. Antioxidantes

Se define estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre los agentes prooxidantes y las defensas antioxidantes del organismo⁷.

Entre los agentes prooxidantes de mayor importancia fisiopatológica se encuentran las especies activadas de oxígeno (también llamadas radicales libres), las moléculas o los fragmentos moleculares con átomos de oxígeno y electrones desapareados: anión superóxido (O_2^-), anión hidroxilo (OH^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), etc⁸. Estas especies activadas participan en una serie de funciones fisiológicas en el organismo, como la detoxificación en el citocromo p450, la regulación del tono vascular o el efecto bactericida en los fagocitos⁹. Pero

en una situación de desequilibrio (estrés oxidativo), pueden provocar alteraciones celulares en la membrana, en la cadena de ADN o en diversas funciones enzimáticas¹⁰.

La principal defensa antioxidante celular frente al daño provocado por estas sustancias prooxidantes es el glutatión (GSH)¹¹, molécula que capta los electrones desapareados de los radicales libres, a través de la acción de la enzima glutatión peroxidada (GPx). Otras sustancias orgánicas también pueden actuar como antioxidantes: carotenos (provitamina A), tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico, bilirrubina, etc.¹²; el organismo cuenta además con las defensas enzimáticas, como la GPx, la superóxido dismutasa y la catalasa, que convierten las especies activadas de oxígeno en moléculas estables, como agua y oxígeno⁹.

Al estrés oxidativo se le atribuye un papel importante en la fisiopatología de múltiples síndromes y enfermedades, en los que se ha podido demostrar un daño directo provocado por las especies activadas de oxígeno, una disminución de las defensas antioxidantes, o un incremento de los productos derivados de la peroxidación de lípidos¹³⁻¹⁷: aterosclerosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, diabetes mellitus, infección por el virus de la inmunodeficiencia humana, fibrosis quística del páncreas, intoxicación por paracetamol, etc.

Es bien conocido el papel de estos mecanismos oxidativos en diversas patologías propias del RNPT, como la retinopatía de la prematuridad (ROP), la displasia broncopulmonar, la enterocolitis necrosante (ECN) o la encefalopatía hipóxico-isquémica¹⁸⁻²². Por su prematuridad, estos neonatos están sometidos a complicaciones y terapias (infecciones, altas presiones de oxígeno, ventilación asistida, nutrición parenteral, etc.), que generan una sobrecarga de especies activadas de oxígeno, que son las responsables, al menos en parte, de las lesiones que caracterizan estas enfermedades. Además de esta exposición a agentes prooxidantes, los RNPT, debido a su inmadurez, nacen deficitarios en defensas antioxidantes^{21,22}.

Para valorar la situación de estrés oxidativo a que está sometido un determinado organismo o fluido, o la actividad de sus defensas antioxidantes, tenemos varias posibilidades de medición:

- Sustancias procedentes de la peroxidación de los lípidos (libres o de las membranas celulares): 4-hidroxi-nonanal, malondialdehído (MDA)²³, etc.
- Capacidad antioxidante total (CAT)²⁴: medición de la capacidad que tienen los antioxidantes del fluido problema para suprimir la reacción de oxidación de un determinado reactivo.
- Actividad de las enzimas que intervienen en las reacciones de captación de electrones, como GPx, catalasa o superóxido dismutasa⁹.
- Concentraciones de otras sustancias antioxidantes: glutatión, vitaminas (A, C, E), etc.

Antioxidantes en la leche humana

Como cualquier fluido orgánico, la leche humana dispone de concentraciones variables de sustancias antioxidantes. Es especialmente rica en enzimas (superóxido dismutasa y GPx), vi-

taminas y sus precursores (carotenos, ácido ascórbico y tocoferoles), en coenzima Q y en lactoferrina (proteína con gran afinidad por los iones del hierro, que evita que éstos actúen como catalizadores de reacciones de oxidación)²⁵⁻²⁸.

Se ha demostrado en diversos estudios que la capacidad antioxidante es mayor en la leche humana que en los sucedáneos, y que la concentración de los productos derivados del estrés oxidativo (MDA) es menor²⁹⁻³⁵, pese a que estas fórmulas estén suplementadas con vitaminas de carácter antioxidante (A, C, E). También se ha comprobado (en muestras de sangre y orina) que los neonatos están sometidos a un menor estrés oxidativo si son amamantados que si se alimentan con sucedáneos^{22,32}.

La capacidad antioxidante de la leche materna es inversamente proporcional a la edad del niño amamantado y a su peso en el momento del nacimiento (mayor cuanto más bajo es el peso)^{31,33,36}, actuando como mecanismo compensador de la relativa deficiencia de antioxidantes de los neonatos, especialmente de los RNPT; esto explica, al menos en parte, el efecto protector que ejerce la leche materna frente a las patologías propias de la prematuridad, como la ECN o la ROP.

Influencia del almacenamiento de la leche sobre la actividad antioxidante

Si la leche no puede administrarse recién extraída (fresca), pero se almacena en refrigeración o congelación, mantiene muchos de sus componentes y propiedades nutricionales e inmunológicos inalterados, como la composición proteica, la concentración de lípidos y lactosa o la concentración de inmunoglobulinas (en especial IgA)⁴. Otras propiedades pueden alterarse con la refrigeración, en especial si sobrepasa las 72 horas, como la capacidad bactericida o el crecimiento de la flora bacteriana saprófita; en cambio, la congelación no las altera^{3,4}.

Varios autores han evaluado la repercusión de la conservación en frío de la leche humana sobre su actividad antioxidante. Van Zoeren-Grobbe et al.³⁵ describen un aumento significativo de la concentración de hidroperóxido del ácido linoleico, que refleja el aumento de la peroxidación de los lípidos de la leche en refrigeración. Ankras et al.³⁶ demostraron un descenso significativo de la concentración de glutatión en leche humana a las 2 horas de la extracción (tanto a temperatura ambiente como refrigerada o congelada). Hanna et al.³⁰ midieron la CAT de la leche humana (comparada con el patrón estándar del trolox), observando que, respecto a la leche fresca recién extraída, se produce una pérdida significativa cuando la leche es refrigerada o congelada más de 48 horas; aun así, mantiene una CAT superior que los sucedáneos.

Nuestro grupo de trabajo también ha mostrado en varias ocasiones estas alteraciones asociadas a la conservación en frío. Miranda et al.³⁷ compararon la actividad GPx y la concentración de MDA en 32 muestras de leche humana en distintos periodos: leche fresca recién extraída, refrigerada a 4 °C durante 24 horas, y congelada a -20 °C durante 10 días. En ambas modalidades de almacenamiento se produce un descenso significativo de la actividad GPx,

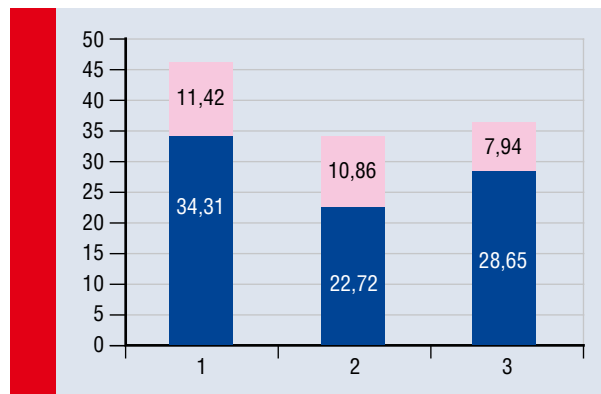


Figura 1. Actividad GPx (en mM/L × min; media ± desviación estándar) en leche fresca (1), refrigerada 24 horas a 4 °C ($p < 0,01$) (2), y congelada 10 días a -20 °C ($p < 0,05$) (3). Modificada de Miranda et al.³⁷

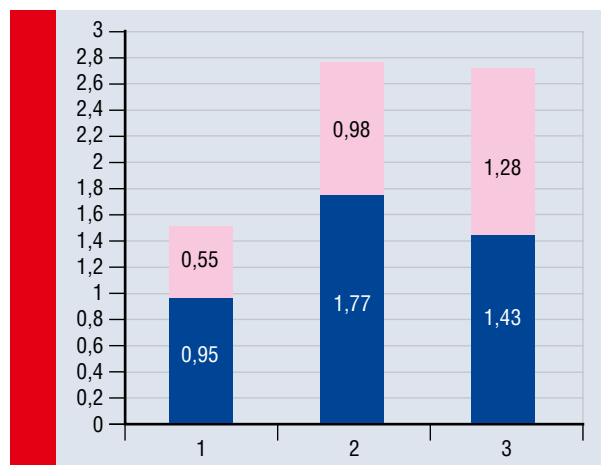


Figura 2. Concentración de MDA (en µM; media ± desviación estándar) en leche fresca (1), refrigerada 24 horas a 4 °C ($p < 0,001$) (2), y congelada 10 días a -20 °C ($p = 0,1$) (3). Modificada de Miranda et al.³⁷

aunque menor en las muestras congeladas (figura 1). La concentración de MDA es más elevada, aunque sólo de forma significativa en las muestras refrigeradas (figura 2); con ello observamos que, aun produciéndose un aumento de la peroxidación de los lípidos de la leche con cualquier tipo de almacenamiento, la congelación proporciona mejores resultados que la refrigeración.

Silvestre et al.³⁸ cuantificaron los cambios en la actividad GPx y en la concentración de MDA en 10 muestras de leche, con distintas temperaturas (-20 y -80 °C) y tiempos de congelación (15, 30 y 60 días). Los resultados observados fueron una disminución significativa con la congelación de la actividad GPx y un aumento de la concentración de MDA, aunque de forma más acusada a -20 que a -80 °C, y en mayor medida cuanto más tiempo se mantiene congelada, incluso a -80 °C, en que empieza a alterarse a partir del mes (figuras 3 y 4).

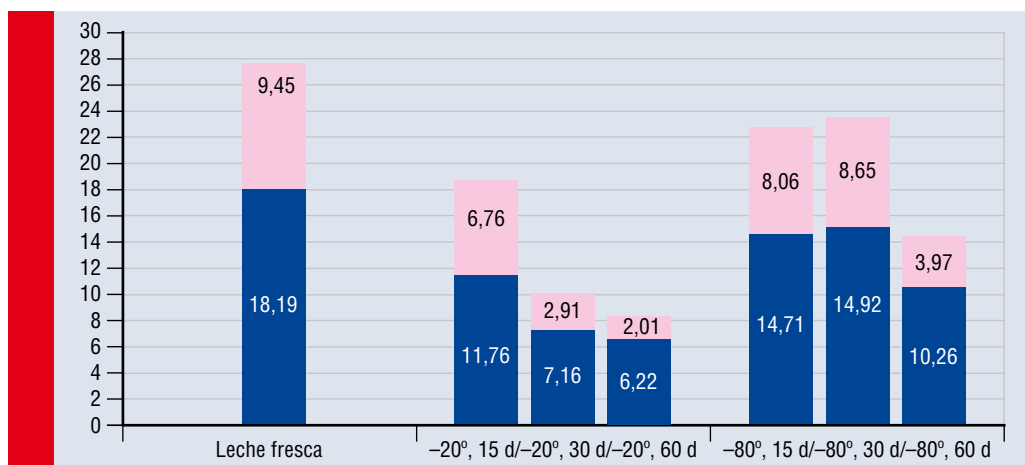


Figura 3. Actividad GPx (en mM/L \times min; media \pm desviación estándar) en leche fresca frente a congelada a -20 y -80 $^{\circ}$ C, durante distintos tiempos de congelación (15, 30 y 60 días). Modificada de Silvestre et al.³⁸

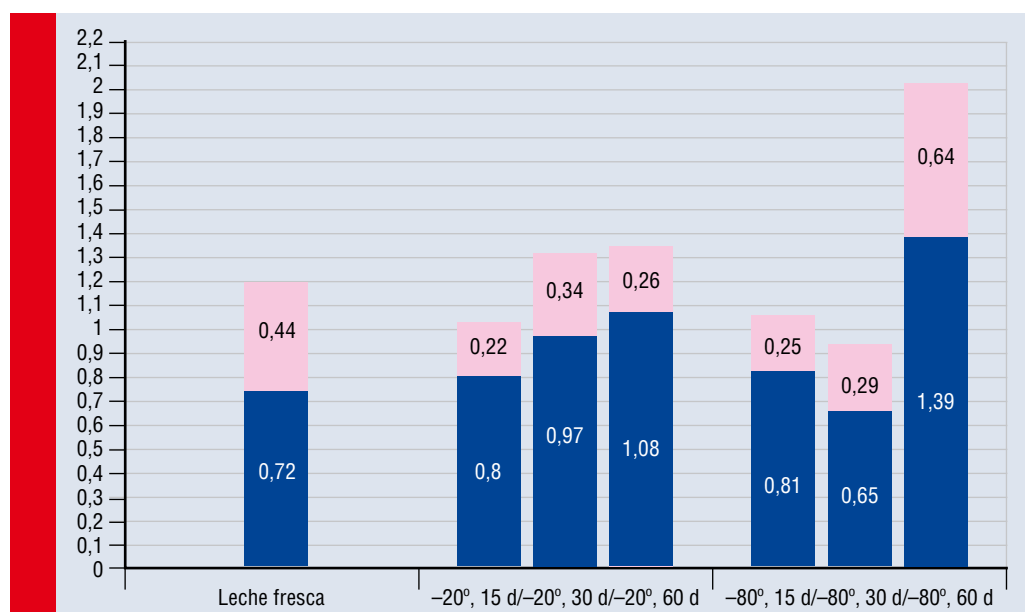


Figura 4. Concentración de MDA (en μ M; media \pm desviación estándar) en leche fresca frente a congelada a -20 y -80 $^{\circ}$ C durante distintos tiempos de congelación (15, 30 y 60 días). Modificada de Silvestre et al.³⁸

Aunque la necesaria conservación de la leche materna afecta a sus propiedades antioxidantes, los estudios que han comparado la capacidad antioxidante o los marcadores de estrés oxidativo de la leche materna y de las fórmulas adaptadas muestran resultados favorables al uso de la primera. Hanna et al.³⁰ demostraron que la CAT es significativamente mayor en la leche materna. Almansa et al.³⁴, tras analizar la concentración de MDA de leche materna congelada durante 2-3 meses, encontraron que dicha concentración es significativamente más baja que la de las muestras de fórmula artificial de inicio recién preparadas ($0,86 \pm 0,38$ frente a $2,64 \pm 1$ μ M; $p < 0,0001$).

Conclusiones y recomendaciones

La conservación de la leche materna provoca cierto deterioro en sus propiedades antioxidantes, de diferente intensidad según la temperatura o la duración del almacenamiento. El deterioro de la

actividad antioxidante es menor con la congelación que con la refrigeración, y es proporcional a la temperatura de conservación, por lo que sería recomendable que la conservación se realizara a la menor temperatura y durante el menor tiempo posible. Es importante tener en cuenta este hecho en los bancos de leche y en los hospitales, donde la leche, ya sea de la propia madre o de donante, estará destinada a recién nacidos enfermos, en general grandes prematuros, que son más susceptibles a sufrir patologías relacionadas con el estrés oxidativo y, por tanto, más dependientes de las propiedades antioxidantes de la leche materna.

En la conservación de leche materna destinada a lactantes sanos (como en el caso de la reincorporación al trabajo de la madre), si solamente tuviéramos en cuenta la actividad antioxidante y el estrés oxidativo, aplicaríamos la misma recomendación de conservar la leche durante el menor tiempo posible. Pero hemos de tener en consideración que dichos lactantes (normalmente de 4-6 meses) ya no tienen el mismo riesgo de

sufrir patologías relacionadas con el estrés oxidativo que los RNPT, y que recibirán sólo una parte de su alimentación en forma de leche extraída y conservada (durante la ausencia de la madre; el resto del día recibirán la leche fresca en condiciones idóneas directamente del pecho de su madre).

Incluso tras la refrigeración o congelación, la leche materna sigue teniendo propiedades antioxidantes superiores a los sucedáneos; además, posee numerosas propiedades nutricionales, inmunológicas y microbiológicas que no se van a deteriorar con el almacenamiento. Por tanto, el amamantamiento y la leche materna continúan siendo la forma óptima de alimentación de cualquier lactante. ■

Bibliografía

- Organización Mundial de la Salud. Nutrición del lactante y del niño pequeño. 55.ª Asamblea Mundial de la Salud. Ginebra, 16 de abril de 2002 (documento A55/15).
- Agostoni C, Braegger C, Decsi T, et al. Breast-feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; 49(1): 112-125.
- Pallás CR, Gómez A. Extracción y conservación de la leche. En: Aguayo J, Gómez A, Hernández MT, et al., eds. (Asociación Española de Pediatría). Manual de lactancia materna. De la teoría a la práctica. Madrid: Editorial Médica Panamericana, 2009; 317-323.
- Academy of Breastfeeding Medicine Protocol Committee. ABM Clinical Protocol #8: Human Milk Storage. Information for home use for full-term infants [internet]. *Breastfeed Med.* 2010; 5(3): 127-130.
- National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE). Donor breast milk banks: the operation of donor milk bank services [internet]. Londres: NICE, 2010 [actualizado el 7 de agosto de 2013; citado el 1 de febrero de 2014]. Disponible en: www.nice.org.uk/guidance/CG93
- Slutzah M, Codipilly CN, Potak D, et al. Refrigerator storage of expressed human milk in the neonatal intensive care unit. *J Pediatr.* 2010; 156(1): 26-28.
- Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82: 291-295.
- Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J.* 1984; 222(1): 1-15.
- Bast A, Haenen GRMM, Doelman CJA. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med.* 1991; 91(3C): 2S-13S.
- Cochrane CG. Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med.* 1991; 12(2): 137-147.
- Meister A. Selective modification of glutathione metabolism. *Science.* 1983; 220(4.596): 472-477.
- Frei B, Stocker R, Ames BN. Antioxidant defences and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; 85: 9.748-9.752.
- Romero FJ, Bosch-Morell F, Romero MJ, et al. Lipid peroxidation products and antioxidants in human disease. *Environ Health Perspect.* 1998; 106 Suppl 5: 1.229-1.234.
- Crystal RG. Oxidants and respiratory tract epithelial injury: pathogenesis and strategies for therapeutic intervention. *Am J Med.* 1991; 91(3C): 39S-44S.
- Jareño EJ, Bosch-Morell F, Fernández-Delgado R, et al. Serum malondialdehyde in HIV seropositive children. *Free Radical Biol Med.* 1998; 24(3): 503-506.
- Portal BC, Richard MJ, Faure HS, et al. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *Am J Clin Nutr.* 1995; 61(4): 843-847.
- Smilkstein MJ, Knapp GL, Kulig KW, et al. Efficacy of oral N-acetylcysteine in the treatment of acetaminophen overdose. *N Engl J Med.* 1988; 319(24): 1.557-1.562.
- Ates O, Alp HH, Caner I, et al. Oxidative DNA damage in retinopathy of prematurity. *Eur J Ophthalmol.* 2009; 19(1): 80-85.
- Saugstad OD. Oxygen and oxidative stress in bronchopulmonary dysplasia. *J Perinat Med.* 2010; 38(6): 571-577.
- Aydemir C, Dilli D, Uras N, et al. Total oxidant status and oxidative stress are increased in infants with necrotizing enterocolitis. *J Pediatr Surg.* 2011; 46(11): 2.096-2.100.
- Dani C, Cecchi A, Bertini G. Role of oxidative stress as physiopathologic factor in the preterm infant. *Minerva Pediatr.* 2004; 56(4): 381-394.
- Ledo A, Arduini A, Asensi MA, et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr.* 2009; 89(1): 210-215.
- Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biol Med.* 1991; 11(1): 81-128.
- Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993; 84: 407-412.
- Xavier AM, Rai K, Hegde AM. Total antioxidant concentration of breast-milk; an eye-opener to the negligent. *J Health Popul Nutr.* 2011; 29(6): 605-611.
- Tijerina-Sáenz A, Innis SM, Kitts DD. Antioxidant capacity of human milk and its association with vitamins A and E and fatty acid composition. *Acta Paediatr.* 2009; 98(11): 1.793-1.798.
- Quiles JL, Ochoa JJ, Ramírez-Tortosa MC, et al. Coenzyme Q concentration and total antioxidant capacity of human milk at different stages of lactation in mothers of preterm and full-term infants. *Free Radic Res.* 2006; 40(2): 199-206.
- Raghuveer TS, McGuire EM, Martin SM, et al. Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatr Res.* 2002; 52(6): 964-972.
- Friel JK, Martin SM, Langdon M, et al. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res.* 2002; 51(5): 612-618.
- Hanna N, Ahmed K, Anwar M, et al. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2004; 89: 518F-520F.
- Ezaki S, Ito T, Suzuki K, et al. Association between total antioxidant capacity in breast milk and postnatal age in days in premature infants. *J Clin Biochem Nutr.* 2008; 42(2): 133-137.
- Aycicek A, Erel O, Kocyigit A, et al. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition.* 2006; 22(6): 616-619.
- Navarro A, Hernández MT, Codoñer P, et al. Actividad antioxidante de la leche humana: relación con factores dietéticos. *Rev Pediatr Aten Primaria.* 2010; 12 Supl 19: e69.
- Almansa I, Miranda M, Jareño E, et al. Lipid peroxidation in infant formulas: longitudinal study at different storage temperatures. *Int Dairy J.* 2013; 33: 83-87.
- Van Zoeren-Grobbe D, Moison RM, Ester WM, et al. Lipid peroxidation in human milk and infant formula: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatr.* 1993; 82(8): 645-649.
- Ankrah N, Appiah-Opong R, Dzokoto C. Human breastmilk storage and the glutathione content. *J Trop Paediatr.* 2000; 46: 111-113.
- Miranda M, Muriach M, Almansa I, et al. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors.* 2004; 20: 129-137.
- Silvestre D, Miranda M, Muriach M, et al. Frozen breast milk at -20 and -80 °C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. *J Hum Lact.* 2010; 26(1): 35-41.