

UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA, PEDIATRÍA Y  
QUÍMICA ORGÁNICA



TESIS DOCTORAL

**“ANÁLISIS DEL CONTENIDO EN MACRONUTRIENTES Y DE  
LAS CAPACIDADES ANTIOXIDANTE Y BACTERICIDA DE LA  
LECHE HUMANA PARA LA ALIMENTACIÓN DE RECIÉN  
NACIDOS PREMATUROS”**

Memoria realizada por María J. Gormaz Moreno

para acceder al grado de Doctora

Dirigida por

PROFESORA MARIA DOLORES SILVESTRE CASTELLÓ

PROFESOR MÁXIMO VENTO TORRES

PROFESORA MERCEDES JUSTE RUIZ

OCTUBRE 2015





D. Francisco Horga de la Parte, Director del Departamento de Farmacología, Pediatría y Química Orgánica de la Universidad Miguel Hernández

AUTORIZA:

La presentación y defensa de la tesis doctoral del trabajo "Análisis del contenido en macronutrientes y de las capacidades antioxidante y bactericida de la leche humana para la alimentación de recién nacidos prematuros" realizado por Dña. María J. Gormaz Moreno bajo la dirección de los Profesores Dña. Dolores Silvestre Castelló, D. Máximo Vento Torres y Dña. Mercedes Juste Ruiz.

Lo que firmo en San Juan a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de Dos Mil Quince.

Fdo. D. Francisco Horga de la Parte





Dña. Dolores Silvestre Castelló, Profesora titular de la Universidad CEU Cardenal Herrera, y D. Máximo Vento Torres y Dña. Mercedes Juste Ruiz, Profesores titulares de la Universidad Miguel Hernández, como directores de la tesis

#### CERTIFICAN

Que el trabajo "Análisis del contenido en macronutrientes y de las capacidades antioxidante y bactericida de la leche humana para la alimentación de recién nacidos prematuros" realizado por Dña. María J. Gormaz Moreno ha sido llevado a cabo bajo nuestra dirección y se encuentra en condiciones de ser leído y defendido como Tesis doctoral en la Universidad Miguel Hernández.

Lo que firmamos para los oportunos efectos en San Juan de Alicante  
a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de Dos Mil Quince.

Fdo. Prof. D. Silvestre  
Directora de tesis

Fdo. Prof. M. Vento  
Director de tesis

Fdo. Prof. M. Juste  
Directora de tesis



*A Javi, Javier, Iciar y Mar  
por iluminar mi vida  
y llenarla de ilusión y energía.*







Un sincero agradecimiento a mis Directores, Máximo Vento, Dolores Silvestre y Mercedes Juste por su estímulo, docencia y orientación para la elaboración de esta tesis doctoral.

Gracias a Máximo Vento por su espíritu innovador, su energía, su entusiasmo y su visión de la investigación y la neonatología. Por ofrecer oportunidades y el apoyo necesario para desarrollar proyectos e inquietudes. Porque trabajar junto a él supone un reto constante, pero es, sobre todo, un privilegio.

Gracias a Dolores Silvestre, por compartir toda su experiencia y conocimiento en el campo de la leche humana, por sus enseñanzas, por su dedicación y motivación.

Gracias a Mercedes Juste por su paciencia y ánimo, por su orientación y su crítica constructiva que ha contribuido a enriquecer el trabajo.

A todos los investigadores colaboradores que han participado en los trabajos que comprende esta tesis quiero agradecer su importante labor, indispensable para el resultado final.

Una mención muy especial para Rosario Sirvent y Amparo Ramón, personal de enfermería del Banco de Leche. Su valiosa labor diaria y el trato exquisito que dispensan a las madres donantes, junto con su colaboración en la investigación, son pilares fundamentales para el buen funcionamiento del banco.

A Isabel Izquierdo, Jefa del Servicio de Neonatología, mi reconocimiento por la capacidad de liderar un servicio complejo, creando un clima de trabajo en equipo tan especial.

A mis compañeros neonatólogos, los más expertos y los más noveles, por todas las experiencias vividas y particularmente por ser excelentes profesionales y personas. De todos ellos continúo aprendiendo cada día.

A las madres donantes cuyo altruismo no tiene límites, por su desinteresada colaboración en favor de recién nacidos prematuros y enfermos y de la investigación científica.

A mis padres, Pepe y Ana, y hermanas, Ana e Inma, por ser modelos del valor del esfuerzo, el respeto y la generosidad. A Javi, que comprende tan bien mi vocación por la neonatología y junto a él, Javier, Iciar y Mar, por iluminar mi vida y llenarla de ilusión y de energía.

A todos y cada uno de vosotros, desde el corazón, muchas gracias.

María





*"..I am the master of my fate:  
I am the captain of my soul."*

*Invictus  
William Ernest Henley*





# INDICE



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	19
1. LA LACTANCIA MATERNA: PATRÓN DE ORO DE LA NUTRICIÓN DEL LACTANTE .....	21
1.1. Propiedades antioxidantes de la leche humana.	
1.2. Propiedades antiinfecciosas: capacidad bactericida.	
2. BANCOS DE LECHE HUMANA Y LECHE HUMANA DONADA.....	24
2.1. Procesamiento y conservación de la leche humana donada.	
2.2. Liofilización como alternativa a la congelación.	
2.3. Control de la leche humana donada en los bancos de leche.	
3. LA NUTRICIÓN DE LOS RECIÉN NACIDOS PREMATUROS.....	27
3.1. Prematuridad y vulnerabilidad frente a la desnutrición.	
3.1.1. Incidencia y consecuencias de la desnutrición.	
3.1.2. Patrón de oro del crecimiento postnatal y requerimientos nutricionales.	
3.1.3. Abordaje de la nutrición del recién nacido prematuro.	
3.1.3.1. Fortificación clásica y nuevas formas de fortificación	
3.2. Prematuridad y vulnerabilidad frente al estrés oxidativo.	
4. VÍAS DE OPTIMIZACIÓN DE LA ALIMENTACIÓN CON LECHE HUMANA .....	32
<b>RESULTADOS</b> .....	35
<b>DISCUSIÓN</b> .....	51
<b>CONCLUSIONES</b> .....	66
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	69

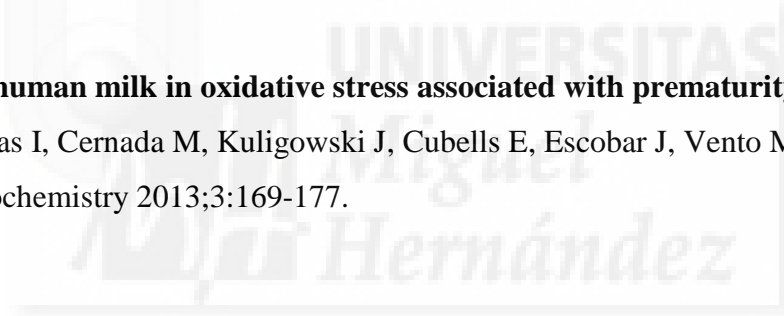
**ANEXOS .....91**

**I. Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk.** Silvestre D, Fraga M, Gormaz M, Torres E, Vento M. *Matern Child Nutr.* 2014 Jul;10(3):373-82.

**II. Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal.** Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, Silvestre D. *Nutr Hosp.* 2011 Jul-Aug;26(4):722-728.

**III. Human milk bactericidal properties: effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components.** Salcedo J, Gormaz M, López-Mendoza MC, Nogarotto E, Silvestre D. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015 Apr;60(4):527-532.

**IV. Role of human milk in oxidative stress associated with prematurity.** Gormaz M, Torres-Cuevas I, Cernada M, Kuligowski J, Cubells E, Escobar J, Vento M. *Journal of Pediatric Biochemistry* 2013;3:169-177.





**ABREVIATURAS**

BLH	Banco de leche humana
DS	Desviación estándar
DBP	Displasia broncopulmonar
Ca	Calcio
P	Fósforo
CAT	Capacidad antioxidante total
CMV	Citomegalovirus
ECN	Enterocolitis necrotizante
EG	Edad gestacional
EMBA	European Milk Banking Association
FI	Fortificación individualizada
FLH	Fortificación de leche humana
GG	Gangliósidos
GPx	Glutation Peroxidasa
HMA	Human milk analyzer
HPLC	High performance liquid chromatography
HTLV	Human T cell lymphotropic virus
HTST	High Temperature Short Time
HUPLF	Hospital Universitario y Politécnico La Fe
IgA	Inmunoglobulina A
LM	Lactancia materna
LH	Leche humana
LHF	Leche humana fortificada
LHD	Leche humana donada
LHDF	Leche humana donada fortificada
LMPV	Leucomalacia periventricular
MDA	Malondialdehído
PN	Peso al nacimiento
RCEU	Retraso de crecimiento extrauterino
RN	Recién nacido
RNMBPN	Recién nacido de muy bajo peso al nacimiento
RNP	Recién nacido prematuro

## ABREVIATURAS

---

RNT	Recién nacido a término
ROP	Retinopatía de la prematuridad
SG	Semanas de gestación
SOD	Superóxido dismutasa
TGF	Tumoral growing factor
VHB	Virus de la hepatitis B
VHC	Virus de la hepatitis C
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana





# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### **1. La lactancia materna: patrón de oro para la nutrición y el desarrollo del lactante.**

La lactancia materna exclusiva constituye el patrón de oro de la nutrición del lactante durante los primeros meses de vida, por la evidencia acumulada durante los últimos años de los beneficios sobre la salud a corto y largo plazo para el lactante y por sus ventajas para la madre que amamanta (1).

El principal beneficio es la reducción de la mortalidad (2-5), de mayor impacto en países en vías de desarrollo, pero también significativo en países desarrollados. El síndrome de muerte súbita del lactante es la principal causa de muerte en países desarrollados durante el primer año de vida y la lactancia materna (LM) reduce su incidencia (3). Además, es relevante la disminución de la morbilidad relacionada con infecciones: las tasas de diarrea, las infecciones de vías respiratorias, la otitis media y las infecciones urinarias son menos frecuentes en los niños amamantados que en los que no lo son (6-9).

La alimentación en períodos críticos del desarrollo, como el período neonatal, tiene impacto en la salud a largo plazo, habiéndose descrito una menor incidencia de obesidad, hipertensión, hipercolesterolemia (10-12), diabetes de tipo I y II (13,14), asma y atopia (15), enfermedad celíaca (16), enfermedad inflamatoria intestinal (17) y leucemias (18,19).

La influencia de la LM sobre el desarrollo neurocognitivo y motor es un tema de debate que continua abierto. Aunque es cierto que algunos estudios indican que los niños amamantados sobresalen en pruebas de desarrollo intelectual y motor, en comparación con los que reciben fórmula (20,21) los mecanismos por los cuales la leche humana (LH) ejercería esta influencia positiva todavía no se conocen en profundidad. Existen posibles explicaciones biológicas para el vínculo causal entre la lactancia materna y el desarrollo intelectual. La LH contiene ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, conocidos por su importancia para el crecimiento y el desarrollo cerebral y la maduración retiniana (22). Se ha descrito una modulación del efecto de la LH en el desarrollo neurológico por variaciones del gen FADS2 implicado en el control del metabolismo de

## INTRODUCCIÓN

---

los ácidos grasos (23). Se considera además que el contacto físico, único entre madre e hijo, proporcionado por la lactancia materna conlleva un estímulo psicosocial y un vínculo que proporcionarían reducción del estrés y beneficios para el desarrollo (24,25). Sin embargo, la influencia del entorno social, y el nivel cultural y económico de los padres también ejerce una poderosa influencia y no se debe olvidar que las madres más concienciadas en relación con la lactancia materna son aquellas con un nivel superior de estudios y de estatus social.

En los recién nacidos prematuros (RNP), particularmente los nacidos con un peso inferior a 1500 gramos, denominados RN de muy bajo peso al nacimiento (RNMBPN), se han descrito beneficios adicionales como la protección frente a patología derivada de la prematuridad, como la enterocolitis necrotizante (ECN)(26) y la retinopatía de la prematuridad grave (ROP) (27), además de una disminución en la tasa de sepsis y meningitis, mejor tolerancia alimentaria y mejor desarrollo neurológico (28).

La LH es un fluido dinámico cuya composición varía según el momento de lactancia (calostro, leche de transición y leche madura), según el método de extracción, entre las tomas, y de una mujer a otra, entre otras circunstancias (29-32). Además de ser un alimento fuente de energía, proteínas, hidratos de carbono, lípidos, vitaminas y minerales (33-35), es un tejido vivo cuyos componentes bioactivos actúan de forma sinérgica proporcionando agentes antioxidantes y antiinfecciosos, favoreciendo el desarrollo de los órganos, la modulación y maduración inmune y la colonización microbiana saludable (36-39).

Entre los componentes bioactivos de la LH se encuentran proteínas como la lactoferrina, la inmunoglobulina A (IgA) secretora y lisozima (33-34), factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento neuronal, la familia de los factores de crecimiento insulina-like y factores de crecimiento del endotelio vascular (40-45). Es fuente de probióticos, y rica en prebióticos como los oligosacáridos (37-39). Adicionalmente contiene hormonas como eritropoyetina, calcitonina, somatostatina, adiponectina, resistina, ghrelina o leptina (46,47) y de células, como macrófagos, células T, linfocitos y células madre (48-53). Las citoquinas y quimioquinas actúan como comunicadoras entre las células (54-56). Por último, se ha descrito la transferencia de material genético (RNA y microRNA) mediante la LM aunque la relevancia es aún desconocida (57).

### 1.1. Propiedades antioxidantes de la LH

La LH es una fuente de antioxidantes exógenos que permite a los RN enfrentarse al estrés oxidativo que se produce de una manera fisiológica en el momento del parto, y, que en el caso de los RNP, es agravado por condiciones clínicas que pueden conllevar la necesidad de recibir soporte ventilatorio y oxígeno suplementario, nutrición parenteral, fototerapia o por determinadas complicaciones como la sepsis de inicio tardío (58).

Los componentes antioxidantes de la LH probablemente actúan de forma sinérgica y actualmente se ha descrito la presencia de vitaminas como ácido ascórbico, retinol, alfa-tocoferol; minerales como zinc, cobre, selenio o manganeso; enzimas antioxidantes como la catalasa, glutatión peroxidasa (GPx), superoxidodismutasa (SOD) y antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (59-62).

Proteínas como la lactoferrina, secuestradora de hierro, ha sido encontrada en elevadas concentraciones en la LH y se ha asociado con la reducción de la generación de radicales libres (63). Además ciertos péptidos podrían actuar desencadenando una respuesta mediante activación genómica del sistema antioxidante en las células del epitelio intestinal que lo protegiera de la agresión de los radicales libres (64,65).

Shoji y colaboradores (2005) cultivaron células de epitelio intestinal pre-incubadas con LH, leche bovina o fórmula artificial y las trataron con hidrógeno para inducir estrés oxidativo. Las células incubadas con LH mantuvieron la tasa de supervivencia más elevada frente a las no tratadas con leche bovina o fórmula artificial (64). Yao y colaboradores (2009) en un modelo de cultivo celular que reproducía la digestión *in vitro* encontraron que tanto la LH como la LH digerida reducen el estrés oxidativo y el daño al DNA inducido por el peróxido de hidrógeno (65).

Si bien la capacidad antioxidante es mayor en etapas iniciales de la lactancia y va disminuyendo posteriormente (66-68), en cualquier caso, es mayor que en la fórmula de inicio (69,70). La LH de madres de RNP y la de recién nacidos a término (RNT) ofrece la misma resistencia al estrés oxidativo y proporciona una protección significativamente mayor que la fórmula (66, 69,70).

### 1.2. Propiedades anti-infecciosas de la leche humana: capacidad bactericida.

La protección frente a infecciones es uno de los efectos más antiguamente reconocidos de la LH. Dicho efecto es ejercido a través de los numerosos componentes descritos previamente: proteínas inmunológicamente activas como la lactoferrina, lactadherina o la sIgA; prebióticos como nucleótidos, lactosa u oligosacáridos. Éstos últimos además ejercen su función mimetizando antígenos bacterianos y compitiendo por los receptores a nivel intestinal. Adicionalmente, glicosaminoglicanos, gangliósidos, proteínas de la membrana del glóbulo graso (mucinas) y las citoquinas y quimioquinas actuando como comunicadores celulares completan la lista de elementos antiinfecciosos de la LH (71-77).

El análisis de la capacidad bactericida de la LH puede realizarse mediante la capacidad de bacteriolisis de *Escherichia coli* NCTC 911 serovar O111:k568(B4):H-, exponiendo dicha cepa a LH y calculando la diferencia en los recuentos de *E. coli* en los controles y en las muestras de LH, expresado como porcentaje del recuento de la muestra control. (78)

## 2. BANCOS DE LECHE HUMANA Y LECHE HUMANA DONADA

Los RN pueden no disponer de LH de su propia madre por diversos motivos: enfermedad materna, contraindicaciones para la lactancia materna, deseo materno de alimentación con fórmula. En ocasiones la dificultad estriba en el establecimiento de la lactancia los primeros días, o en producir volumen de LH suficiente que cubra las necesidades del RN. En el caso de RNP existe consenso en considerar la posibilidad de utilizar la leche humana donada (LHD) pasteurizada, proporcionada por un banco de leche humana (BLH) como la mejor alternativa, especialmente por su efecto protector frente a la enterocolitis necrotizante (1,79,80). Los BLH están ampliamente distribuidos en algunas regiones del mundo: en Europa funcionan 203 bancos agrupados en la European Milk Bank Association (EMBA). En España hace aproximadamente una década se implantó el primer BLH, existiendo 8 en la actualidad. El BLH del Hospital Universitario y Politécnico La Fe (HUPLF) fue el tercero inaugurado en España e inició su actividad en Marzo 2010. La finalidad de los BLH es proporcionar LHD que ha sido procesada y analizada para garantizar su calidad y seguridad. Desde su inauguración en Marzo 2010



hasta el 30 de Junio de 2015 el BLH ha distribuido 2130 litros de LHD proporcionada por 720 madres donantes, a 950 receptores.

La presencia de un BLH en una unidad neonatal no interfiere con la lactancia de los niños ingresados; por el contrario, existe evidencia de que la tasa de LM al alta hospitalaria es mayor en aquellas unidades neonatales dotadas de un BLH que en las que no disponen de ello (81).

### 2.1. Procesamiento y conservación de la LHD en los BLH

La LH es un producto biológico, y por lo tanto, un potencial transmisor de ciertas enfermedades infecciosas. Se ha descrito la presencia de bacterias: *S. aureus*, *S. agalactiae*, *E. Coli*, *Pseudomonas spp*, *Klebsiella spp.*, *Serratia spp.*, *Salmonella spp*; virus como el CMV, VIH, HTLV, VHB, VHC, parvovirus; y parásitos como el *trypanosoma cruzi*) (82-84). Para controlar este riesgo, en los BLH se adoptan estándares aprobados internacionalmente, basados en la normativa que rige la donación de sangre, tejidos u órganos (85-87). A las candidatas a donar leche se les realiza a una entrevista clínica sobre estado de salud y hábitos de vida, junto con una extracción de sangre para realizar estudio serológico y de carga viral.

Adicionalmente, la LHD es sometida a tratamiento térmico para inactivar los potenciales virus. En la actualidad, el tratamiento térmico estandarizado es la pasteurización Holder, es decir calentamiento a 62.5°C durante 30 minutos seguido de enfriamiento rápido. Se están investigando alternativas que probablemente pudieran alterar en menor grado la composición de la leche, como la pasteurización a elevada temperatura durante corto tiempo, High Temperature Short Time (HTST) (88,89). Tras la pasteurización (90), la LHD es conservada congelada a -20°C o -80°C hasta su distribución, durante un tiempo variable.

La conservación y procesamiento de la LHD, indispensable para garantizar su seguridad, puede conllevar alteraciones en las propiedades físico-químicas y nutricionales de la LH e interferir en algunas propiedades bioactivas.

La congelación permite alargar la vida útil de la LH, ya que se minimizan los cambios en la composición de la leche, y se retardan los deterioros por procesos químicos y físicos. Numerosos estudios han evaluado el efecto de la congelación sobre las propiedades de la LH, microbiológicas, nutricionales y funcionales.

A) Efecto sobre propiedades microbiológicas: se ha descrito que durante la congelación se inhibe el crecimiento bacteriano y pueden destruirse algunos virus (91,92).

B) Efecto sobre propiedades nutricionales: desde el punto de vista nutricional se han referido una disminución de contenido en grasa del 13% y calórico del 8% tras 3 meses a  $-20^{\circ}\text{C}$  (93), disminución de la lisina disponible aunque no el contenido proteico total tras 15 días a  $-20^{\circ}\text{C}$  (94), y no se han descrito cambios en la lactosa (95).

C) Efecto sobre propiedades funcionales: la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante un mes disminuye la concentración de lisozima, IgA soluble, actividad lactoperoxidasa, sin cambios en la lactoferrina. (96). Se ha descrito la estabilidad de la actividad bactericida durante la refrigeración hasta 72h o en congelación durante 7 días, pero un descenso significativo de esta propiedad si la misma refrigeración se prolonga durante 96 horas (97). La capacidad antioxidante total no se modifica durante la refrigeración hasta 96 horas (91,98), pero durante la conservación en frío prolongada hasta 60 días se ha demostrado un descenso de la actividad glutathion peroxidasa (ya presente a los 30 días) y un aumento de los niveles de malondialdehído (MDA) (99).

La pasteurización también conlleva pérdida de componentes bioactivos: se han descrito reducciones significativas en los niveles de sIgA, lisozima, lipasa estimulada por sales biliares, citokinas, lipasas, TGF- $\beta$ , y adiponectina, entre otras proteínas (100,101). Los múltiples ciclos congelación-descongelación unidos a la pasteurización parecen ser lo más dañino para algunas proteínas (96). Pocos estudios han evaluado la capacidad bactericida tras la pasteurización, y los resultados indican que ésta disminuye tras el tratamiento térmico (102,103). La capacidad antioxidante también se ve afectada negativamente: se ha demostrado una disminución de la capacidad antioxidante total y de la glutathion peroxidasa tras la pasteurización (104).

### 2.2. Liofilización como alternativa a la congelación

La liofilización o deshidrocongelación es un proceso en el que se congela el producto y posteriormente se introduce en una cámara de vacío para realizar la separación del agua por sublimación. De esta manera se elimina el agua desde el estado sólido al gaseoso del ambiente sin pasar por el estado líquido. Para acelerar el proceso se utilizan ciclos de congelación-sublimación, con los que se consigue eliminar prácticamente la totalidad del agua libre contenida en el producto original, preservando la estructura molecular de la sustancia liofilizada.

Es una técnica de conservación muy apreciada para productos complejos que requieren garantías de calidad, tales como fármacos, cepas microbianas, vacunas, tejidos biológicos y algunos alimentos (105). Previene el crecimiento bacteriano y retrasa la oxidación grasa (106). El uso de la liofilización para el almacenamiento de la LM puede ser una buena alternativa a la congelación, alargando la viabilidad del producto, reduciendo el espacio de almacenamiento y facilitando el transporte, con la consecuente reducción de costes (105,107). Hasta la fecha esta técnica ha sido escasamente explorada, y los trabajos publicados se han limitado al estudio de los efectos sobre vitaminas, ácidos grasos, o capacidad antioxidante (108). Los efectos de la liofilización sobre la composición nutricional y las propiedades microbiológicas de la LH no han sido claramente establecidos.

### 2.3. Control de la leche humana donada en los bancos de leche.

La LHD es un producto biológico, con un riesgo inherente de transmisión de enfermedades infecciosas, lo que puede suponer una limitación en su empleo. Este riesgo se controla con la entrevista, la analítica realizada a la madre, el tratamiento térmico y el cultivo post pasteurización de la LHD. No se acepta para su distribución ningún lote en el que haya algún tipo de crecimiento bacteriano tras la pasteurización.

La variabilidad de las características de las madres donantes es otra limitación: con frecuencia difieren de las madres de los receptores en la edad de gestación y el momento de lactancia. Se ha descrito una gran variabilidad de la composición de la LHD que proporcionan los BLH (109). La idoneidad nutricional de la LHD es un tema de debate abierto. Se ha descrito un menor crecimiento a corto plazo en los RNP alimentados con LHD frente a fórmula, aunque estas diferencias no fueron significativas en el seguimiento a largo plazo (80) Por este motivo, y considerando que las necesidades nutricionales son diferentes entre los RN, es muy recomendable la incorporación de analizadores de macronutrientes a los BLH.

### **3. LA NUTRICIÓN DEL RECIÉN NACIDO PRETÉRMINO.**

La nutrición de los RNPT constituye un auténtico desafío para el neonatólogo por varios motivos: proporcionar los nutrientes adecuados para un crecimiento postnatal igual al menos al crecimiento intraútero en el contexto de nacimiento prematuro y comorbilidades importantes es extremadamente difícil: por otra parte, la inmadurez de su sistema digestivo y neurológico obliga a una introducción lenta y progresiva de la alimentación enteral, lo que implica que durante semanas o meses la LH sea suministrada por sonda,

sufriendo una manipulación previa que repercutirá de forma variable en sus componentes bioactivos.

A partir de la maduración del reflejo de succión deglución, en torno a las 34 semanas, se produce la transición a la alimentación por succión, de forma ideal directamente al pecho.

### 3.1. Prematuridad y vulnerabilidad frente a la desnutrición postnatal

#### 3.1.1. Incidencia y consecuencias de la desnutrición postnatal.

Los avances en la atención neonatal en las últimas décadas se han acompañado de una mejoría en la supervivencia, sin embargo persiste una elevada incidencia de retraso de crecimiento extrauterino. La incidencia publicada es ampliamente variable debido a la heterogeneidad de definiciones, intervenciones nutricionales y población estudiada, con cifras que oscilan entre el 11-97%. La definición más apropiada sería la que contempla la evolución del percentil del peso o el aumento de la desviación estándar al alcanzar la edad corregida de a término, mejor que al alta hospitalaria, debido a la variabilidad en las prácticas de distintos centros. Stoll publica una incidencia de peso < p10 a las 36 semanas de edad postconcepcional del 79% en RNP con EG < 28 semanas (110).

Si bien el impacto de la nutrición en las etapas iniciales de la vida en el crecimiento se demostró hace años (111), en los últimos años se ha reconocido, además, la repercusión sobre el desarrollo neurológico de los RNP, tanto estructural como funcionalmente (112,113). En los últimos años se ha establecido la relación de este desarrollo con la gravedad de la patología en el período neonatal (112). Es relevante el concepto de la “ventana de oportunidad” que supone esta etapa de la vida: comparando la velocidad de crecimiento en el período comprendido entre el nacimiento y la edad postmenstrual de 40 semanas, con los períodos entre las 40 semanas y los 4 meses, y entre los 4 y 12 meses de vida; sólo el adecuado crecimiento en la primera etapa tuvo impacto significativo en el neurodesarrollo posterior. Por tanto, el período postnatal inmediato se convierte en un período crítico de intervención nutricional (114).

### 3.1.2. Patrón de oro del crecimiento postnatal y recomendaciones nutricionales.

El gold standard del crecimiento postnatal es desconocido, y se acepta como mejor opción el objetivo de lograr un crecimiento al menos igual al crecimiento intrauterino esperado (115). Con esta finalidad los últimos años se ha propugnado una nutrición denominada por algunos “agresiva” generándose el debate sobre el riesgo asociado de desarrollo de síndrome metabólico en la edad adulta. (116).

La European Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) ha publicado recomendaciones nutricionales para la alimentación enteral y parenteral de los RNP (117,118).

### 3.1.3. Abordaje de la nutrición del recién nacido prematuro

Desde hace diez o quince años se ha intentado implantar protocolos estandarizados de alimentación, que incluyen la combinación de nutrición parenteral precoz y la introducción de la nutrición enteral mínima o trófica, seguida del aumento progresivo de la nutrición enteral junto con la reducción progresiva de la nutrición parenteral hasta alcanzar los aportes totales. La comparación de esta práctica con controles históricos muestra beneficios como son una recuperación del peso al nacimiento más precoz, lograr la alimentación enteral completa más precozmente con menor duración de la nutrición parenteral, y alcanzar mejores valores antropométricos a las 36 semanas de edad postmenstrual o al alta del período de hospitalización (119,120). Los protocolos estandarizados se asocian a menor incidencia de ECN y de sepsis de comienzo tardío, y de las patologías relacionadas con el retraso de crecimiento extrauterino (RCEU) (121,122).

#### 3.1.3.1 Fortificación clásica y nuevas formas de fortificación

Aunque la LH es el alimento de elección y, en su defecto, la LHD se considera la mejor alternativa especialmente por su protección frente a la ECN, en ambos casos (especialmente con la LHD), las necesidades calóricas, proteicas, de minerales y vitaminas no se alcanzan (117). Los fortificantes de leche humana (FLH) se han diseñado para suplementar la leche materna en energía, proteínas, calcio, fósforo, vitaminas, y en ocasiones hierro. La mayoría están elaborados a partir de proteína bovina; aunque existe un fortificante elaborado con leche materna donada, actualmente no comercializado en España. Los suplementos están indicados en RN  $\leq$ 32 semanas de gestación (SG) o PN < 1500

## INTRODUCCIÓN

---

gramos o en prematuros algo más mayores que no toleran aportes elevados de leche materna ( $\geq 180\text{ml/kg/día}$ ).

Existe evidencia acerca de los beneficios del uso de la LH fortificada (LHF o LHDF) por lo que se ha consolidado como práctica habitual del manejo nutricional de los RNP. Se ha demostrado mejores tasas de ganancia de peso, talla y perímetro cefálico, mejores resultados de balance nitrogenado y cifras más elevadas de urea, albúmina sérica, proteínas totales y prealbúmina, normalización de los índices bioquímicos de estado mineral óseo, sin aumento de la incidencia de ECN (123).

La estrategia clásica de fortificación, es decir, atribuir una composición estable a la leche materna y añadir una cantidad fija de fortificante, no se ajusta a las necesidades reales de los recién nacidos pretérmino en ocasiones por exceso, pero habitualmente por defecto de aporte proteico (124,125). Dado que el aporte de proteínas es, probablemente, el principal factor limitante del crecimiento, se han diseñado nuevas estrategias de fortificación dirigidas fundamentalmente a aumentar el aporte proteico de la dieta.

Las dos estrategias de fortificación individualizada se basan en el análisis de macronutrientes de la LH (denominada por algunos autores “fortificación ajustable”), o en el metabolismo proteico del RN (denominada por algunos autores “fortificación individualizada”). En este trabajo se refiere como fortificación individualizada (FI) a los dos métodos, porque ambos se diferencian de la fortificación clásica o standard en que su objetivo es individualizar los aportes que el paciente finalmente recibe, aunque sea por vías diferentes. La FI basada en el análisis periódico de la LH se basa en dicho resultado para adicionar la cantidad necesaria de fortificante hasta cubrir las necesidades teóricas según las recomendaciones actuales. Esta estrategia ha demostrado reducir de manera significativa la variabilidad en los aportes nutricionales permitiendo mantener la ingesta proteica y la ratio proteína:energía en el intervalo de las recomendaciones nutricionales (126) y mejorar el crecimiento (127). La FI basada en el metabolismo proteico se basa en la determinación periódica de urea como marcador de estado metabólico proteico y el aumento o disminución de la cantidad de proteína a aportar hasta lograr las cifras deseadas. También se ha descrito una mejoría de la ganancia ponderal (124). Recientemente Biasini ha publicado una mejoría en el desarrollo neurológico en los RNP que recibieron un mayor aporte proteico (3,5g/kg vs 4,8 g/kg) (128).

La necesidad de fortificar de una manera individualizada ha quedado bien establecida, sin embargo, no está claramente definido cómo hacerlo. Algunos estudios (127) añaden más cantidad del fortificante con multicomponentes, con la desventaja potencial de aportar un exceso de vitaminas o minerales. En otros estudios (129) se añaden módulos de grasa, hidratos de carbono y fundamentalmente proteína para optimizar la fortificación, no encontrado efectos secundarios. Sin embargo, estos estudios no están dotados de la suficiente potencia estadística para valorar ciertos potenciales efectos adversos, como por ejemplo su influencia sobre la incidencia de ECN. La adición de fortificantes, vitaminas, minerales, y otros nutrientes a la leche incrementa su osmolaridad y este hecho debe ser tenido en consideración (130). Las recomendaciones sobre los límites máximos de osmolaridad se definieron hace años y están basadas en recomendaciones de expertos. Posteriormente no se han llevado a cabo estudios que proporcionen evidencia sobre cuál es el límite máximo de osmolaridad seguro (129).

### 3.2. Prematuridad y vulnerabilidad frente al estrés oxidativo postnatal.

En las últimas décadas, la supervivencia de los recién nacidos nacidos muy prematuramente ha aumentado sustancialmente. La supervivencia de niños nacidos a las 24 y 25 semanas de edad gestacional aumentó de 25 a 50% a comienzos de los 90 a del 40-60% en los 2000 en Europa y Norteamérica. El descenso de la mortalidad es atribuible a varios factores como la regionalización, la generalización del uso de los corticoides antenatales, nuevas modalidades de ventilación mecánica y el uso del surfactante. Sin embargo, este aumento de supervivencia no se ha acompañado en paralelo de un descenso simultáneo de la morbilidad. La prevalencia de complicaciones serias como la retinopatía de la prematuridad, la displasia broncopulmonar, la leucomalacia periventricular o la desnutrición postnatal ha permanecido inalterada especialmente en el grupo de recién nacidos muy prematuros (131).

Como se ha indicado en párrafos anteriores, el sistema antioxidante de los recién nacidos prematuros (RNPT) es inmaduro lo que les predispone a la denominada “Enfermedad por radicales libres de la prematuridad”. Los radicales libres derivados del estrés oxidativo son factores contribuyentes relevantes de una respuesta inflamatoria generalizada, base para el daño orgánico o sistémico. El estrés oxidativo es un factor clave en el desarrollo de patología propia de la prematuridad como la displasia broncopulmonar (DBP) (132), la ECN (133), la ROP grave (134) o la leucomalacia periventricular (LMPV) (135).

Los recién nacidos alimentados con fórmula presentan un aumento de marcadores de estrés oxidativo en orina (136). En recién nacidos prematuros alimentados con LM también se ha objetivado una mejor defensa frente al estrés oxidativo, presentando una menor eliminación de marcadores de daño oxidativo al DNA en orina (137,138). La adición de fortificante de LH en un estudio permitió observar que esta protección no se mantenía en la LHF (139).

#### **4. VÍAS DE OPTIMIZACIÓN DE LA ALIMENTACIÓN DEL NEONATO CON LECHE MATERNA**

Actualmente las unidades neonatales atienden a un número creciente de pacientes inmaduros extremadamente vulnerables en los que la nutrición en la etapa inicial ejercerá un papel determinante en su desarrollo posterior. La lactancia materna al pecho es el patrón de oro de la alimentación, pero la realidad es que durante semanas o meses, para beneficiarse de la LH, ésta deberá ser extraída, refrigerada o congelada, pasteurizada en el caso de la LHD, y administrada por sonda. El desafío consiste en proporcionar una LH, de madre propia o donada, que preserve todas sus propiedades beneficiosas y que aporte los nutrientes adecuados.

La LH es un importante factor ambiental potencialmente modificable. La intervención es factible en varios estadios: modificando la dieta materna, para aumentar la capacidad antioxidante (140,141) o mejorar el perfil lipídico (142), posteriormente mediante la fortificación con multicomponentes (143) o incluso mediante la adición de otros componentes bioactivos en estudio como BSSL, probióticos, lactoferrina o inositol, que pueden conferir beneficios adicionales tan importantes como mejorar la absorción grasa (144), disminuir la incidencia de ECN (145) y sepsis (146) e incluso disminuir la mortalidad (144-146).

La LH es un recurso muy valioso en las unidades neonatales, y como consecuencia de su valoración se está produciendo un cambio en la concepción y el abordaje de su utilización por parte de los profesionales que la manejan, creándose unidades de procesamiento de LM, dotadas de recursos materiales y humanos adecuados, tecnólogos de alimentos, dietistas, y otros etc (147). Hay un interés creciente por la investigación en cada uno de los pasos implicados en la alimentación con LH que puedan optimizar su utilización. Entre las líneas a desarrollar se encuentra la búsqueda de técnicas de con-



servación que preserven la capacidad antioxidante, técnicas alternativas de conservación como la liofilización y el análisis de LH en las unidades neonatales y los BLH.

Esta tesis doctoral basada en la línea de trabajo del análisis de la leche materna recoge el trabajo realizado y los resultados publicados en los siguientes artículos:

- I) Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk. Silvestre D, Fraga M, Gormaz M, Torres E, Vento M. *Matern Child Nutr.* 2014 Jul;10(3):373-82.
- II) Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal. Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, Silvestre D. *Nutr Hosp.* 2011 Jul-Aug;26(4):722-8.
- III) Human milk bactericidal properties: effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components. Salcedo J, Gormaz M, López-Mendoza MC, Nogarotto E, Silvestre D. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015 Apr;60(4):527-32.
- IV) Role of human milk in oxidative stress associated with prematurity. Gormaz M, Torres-Cuevas I, Cernada M, Kuligowski J, Cubells E, Escobar J, Vento M. *Journal of Pediatric Biochemistry* 2013;3:169-177.





# RESULTADOS



RESULTADOS***I) Comparación de la espectroscopia de transmisión de infrarrojo medio con los métodos bioquímicos para la determinación de macronutrientes en la leche humana.***

Resultados de la validación de los métodos

La Tabla 1.1 recoge la precisión y la linealidad expresada como coeficiente de correlación de los métodos empleados.

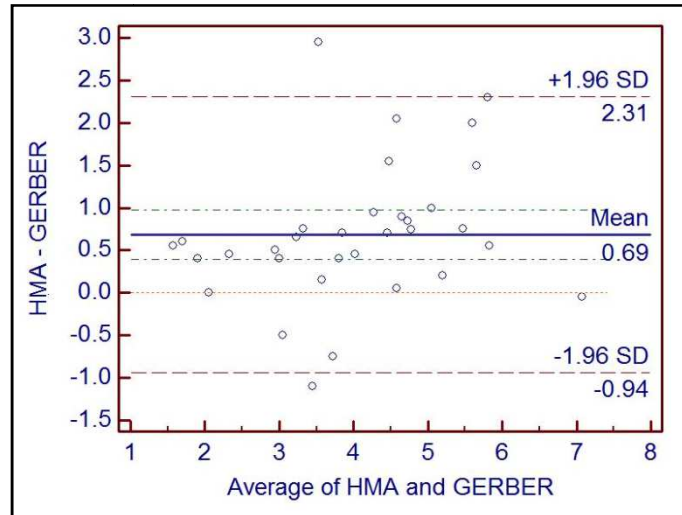
*Tabla 1.1. Precisión y linealidad de los métodos empleados.*

<b>MÉTODO</b>	<b>PRECISIÓN (%)</b>	<b>LINEALIDAD COEFICIENTE DE CORRELACION <math>r^2</math></b>
<b>Gerber lípidos</b>	1.29%	0.9996
<b>Bradford proteínas</b>	6.91%	0.9977
<b>Chloramine-T lactosa</b>	2.15%	0.9928
<b>Miris HMA lípidos</b>	5.19%	0.9988
<b>Miris HMA proteína</b>	3.08%	0.9822
<b>Miris HMA lactosa</b>	1.40%	0.9975

Las figuras 1.1-1.3 muestran las diferencias entre los métodos bioquímicos empleados para la determinación de lípidos (Gerber)(148), proteínas (Bradford)(149) y lactosa (Chloramine-T)(150) y el analizador de infrarrojos Human Milk Analyzer (HMA) usando el método estadístico de Bland-Altman (151,152).

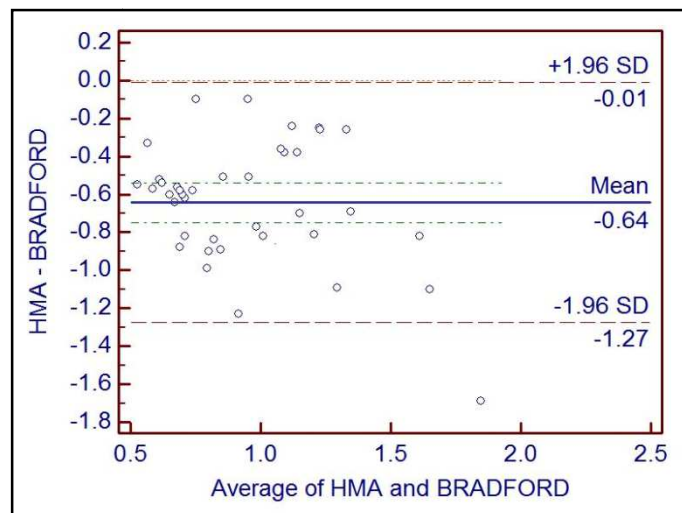
Así, la Figura 1.1 muestra las diferencias media (-0.75) y la desviación estándar 1.96 SD (0.92–2.34) del análisis de los lípidos mediante los métodos Gerber y HMA. El análisis mediante IR HMA muestra valores más elevados. Todos los valores están incluidos en el intervalo de confianza excepto dos.

Figura 1.1. Diferencia en la grasa entre el método HMA- Gerber



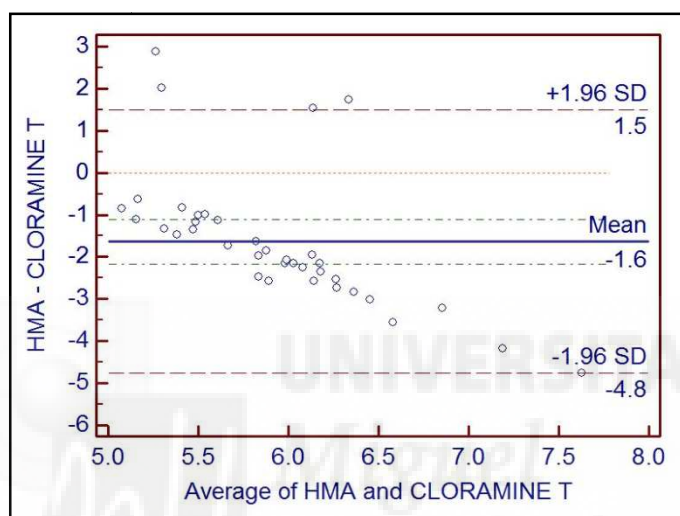
En la Figura 1.2 se muestran las diferencias media (0.6) y desviación estándar 1.96 SD (0.07–1.12) de la determinación de proteína mediante los métodos Bradford y HMA. El modo Bradford muestra valores más elevados que el método HMA: sin embargo, todos los valores están dentro del intervalo de confianza. Las diferencias no muestran ninguna tendencia estadísticamente significativa.

Figura 1.2. Diferencia en la proteína entre el método HMA-BRADFORD



La Figura 1.3 representa las diferencias media (1.99) y la desviación estándar 1.96 SD (0.32– 4.5) de la lactosa determinada mediante el método Chloramine-T y el método HMA. Los valores de lactosa determinados mediante el método ChloramineT son más elevados que los obtenidos mediante el HMA. Todos los valores excepto uno están dentro del intervalo de confianza. Las gráficas muestran la tendencia a un aumento en las diferencias con valores mayores de lactosa.

Figura 1.3 Diferencia en la lactosa entre el método HMA- CLORAMINE T



La Tabla 1.2 muestra los valores medios y DS para los macronutrientes (lípidos, proteína y lactosa). La aplicación del test t de Student para datos pareados muestra que las diferencias mediante el análisis directo con HMA y el análisis con la metodología tradicional son significativas para los tres nutrientes ( $P < 0.01$  y  $P < 0.001$  para lípidos, proteínas y lactosa, respectivamente).

**Tabla 1.2.** Comparación de concentraciones de lípidos, proteínas y lactosa (expresadas en g/100 ml) determinadas con el autoanalizador por infrarrojos (HMA) y los métodos convencionales de laboratorio (LAB) utilizando la t de Student para muestras pareadas.

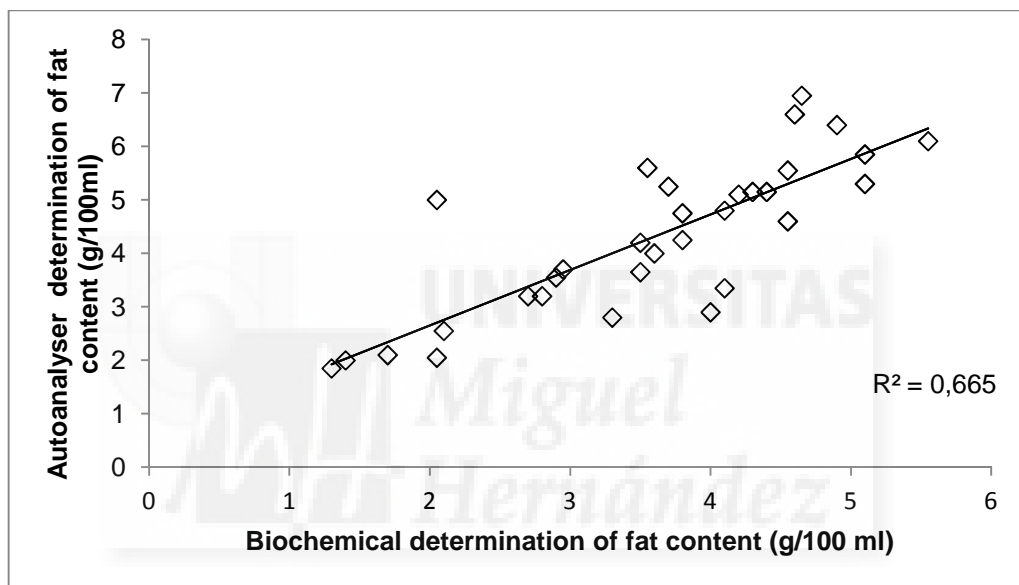
Componentes (g/100mL)	n	HMA	LAB	p
Lípidos	32	4.29 ± 1.43	3.59 ± 1.13	<0.01
Proteínas	36	0.59 ± 0.29	1.19 ± 0.27	<0.001
Lactosa	32	4.9 ± 0.17	6,89 ± 0.91	<0.001

## RESULTADOS

Tras confirmar la existencia de diferencias entre los métodos, evaluamos la existencia de una relación lineal entre ellas.

Las Figuras 1.4-1.6 representan los scatter plots para lípidos, proteínas y lactosa evaluados tanto por los métodos tradicionales (representados como “bioquímicos) como automatizado. El análisis de regresión para los lípidos ( Fig 1.4) muestra un cociente de correlación significativo  $r = 0,81$  ( $p < 0,001$ ).

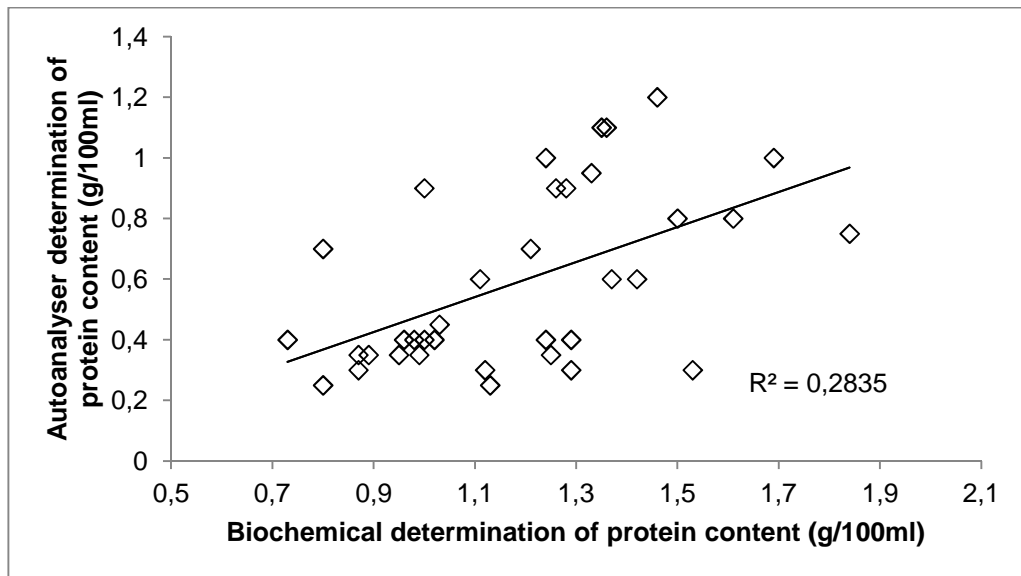
Figura 1.4. Correlación análisis de grasa mediante autoanalizador y método bioquímico.



El análisis de regresión para proteínas también muestra un cociente de correlación significativo  $r = 0.53$  ( $p < 0.02$ ).

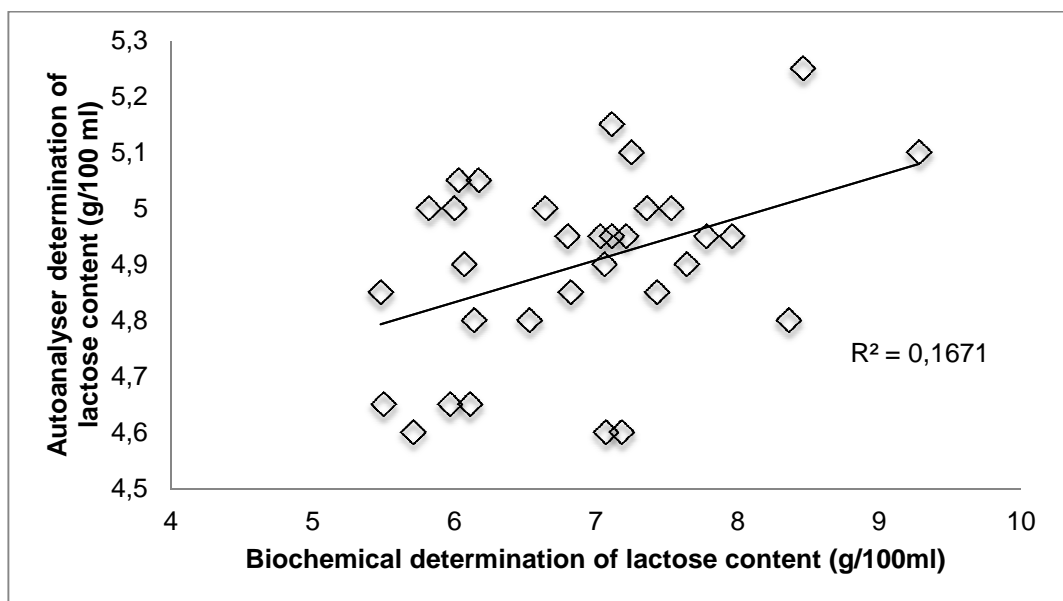


Figura 1.5. Correlación análisis de proteínas mediante autoanalizador y método bioquímico.



El análisis de regresión también muestra un cociente de correlación significativo para la lactosa  $r = 0.40$  ( $p < 0,02$ ).

Figura 1.5. Correlación análisis de lactosa mediante autoanalizador y método bioquímico.



**II) “Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal”.**

Se analizan el pH y los contenidos de malondialdehído (MDA) y capacidad antioxidante total (CAT), y su estabilidad bajo las condiciones de refrigeración, así como las relaciones entre ellos.

Los valores medios de los parámetros evaluados, para cada etapa de refrigeración considerada se muestran en la tabla 2.1

*Tabla 2.1. pH, concentración de MDA y CAT en leche fresca y en leche mantenida a 4°C durante 12h, 24h, 36h, 48h. ( Valor medio ± desviación estándar)*

<b>Tiempo de almacenamiento</b>	<b>pH (21 valores = todos)</b>	<b>MDA (µM)</b>	<b>CAT ( mmoles equivalentes de Trolox)</b>
<b>Fresca</b>	7,5 ± 0,16	1,15 ± 0,07	68,55 ± 15,74
<b>12h</b>	7,28 ± 0,15	1,36 ± 0,23	67,48 ± 18,58
<b>24h</b>	7,09 ± 0,22	1,7 ± 0,49	63,07± 14,87
<b>36h</b>	6,83 ± 0,26	2,50 ± 0,32	67,78 ± 17,81
<b>48h</b>	6,70 ± 0,19	2,47 ± 1,02	63,02 ± 20,56

Todas las poblaciones estudiadas, mostraron una distribución normal en los tres parámetros analizados, lo que permitió aplicar ANOVA multifactorial (de 2 factores: mujer y tiempo de almacenamiento en refrigeración) como pruebas estadística.

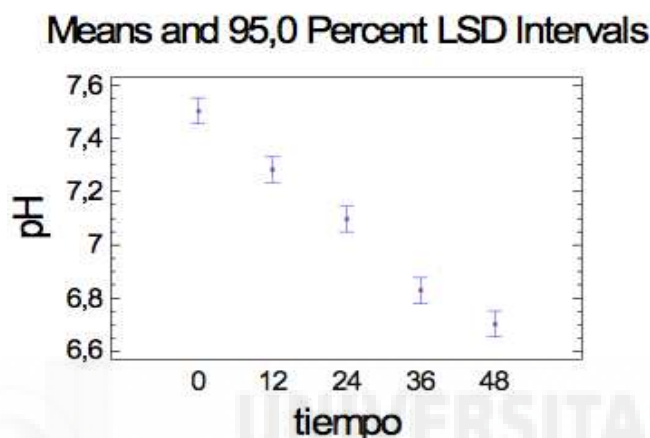
El estudio longitudinal de la evolución de los parámetros mostró los siguientes resultados:

Los valores de pH en leche fresca presentaron una amplia variabilidad, con valor máximo de 7,68 y mínimo de 7,07, siendo la mediana 7,56.

El pH de la leche presenta variaciones altamente significativas para los dos factores analizados: mujer donante y tiempo de almacenamiento (p = 0,0000, en ambos). El pH desciende desde leche fresca hasta el final del estudio de forma progresiva y significativa entre cualquiera de las etapas consideradas, como puede observarse en la figura 2.1. Así, el pH es máximo en leche fresca (7,50 ± 0,16) y, a partir de este momento, des-

ciende bruscamente, presentando en cada una de las etapas un valor significativamente mayor que en la siguiente, obteniendo el mínimo valor de pH a las 48 horas de extracción ( $6,70 \pm 0,19$ ).

Figura 2.1 pH de leche humana: evolución longitudinal. Leche fresca (punto 0) y leche mantenida a 4°C durante 12h, 24h, 36h y 48h. Intervalos para la media. Test LSD.

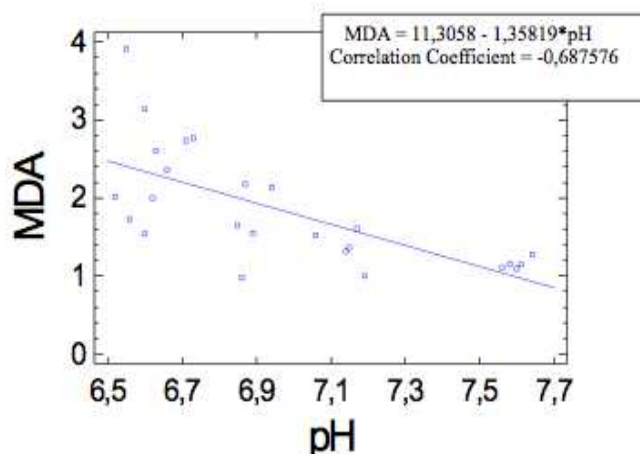


Los valores de MDA leche fresca presentaron una amplia variabilidad, con valor máximo de 1,09 y mínimo de 1,28, siendo la mediana de 1,15.

En la tabla 2.1 puede comprobarse el incremento de la concentración de MDA que se obtuvo a lo largo del estudio. La aplicación del ANOVA multifactorial indica que los cambios presentados en este marcador de oxidación lipídica son estadísticamente significativos en relación al tiempo de almacenamiento en refrigeración ( $p = 0,0015$ ), pero no respecto a la variabilidad encontrada entre las mujeres donantes (NS). Las diferencias existentes entre las etapas analizadas se evidenciaron por aplicación posterior del test LDS (fig. 2.2). Como puede observarse en la figura 2.2, la concentración de MDA aumenta ligeramente desde el inicio, en leche fresca ( $1,15 \pm 0,07$  mM), aunque este incremento no es significativo durante las primeras 24 horas de refrigeración. A partir de este punto, si la refrigeración se prolonga hasta las 36 horas, la concentración obtenida de MDA alcanza valor  $2,50 \pm 0,49$  mM, aumento significativo estadísticamente respecto a los anteriores, permaneciendo constante a partir de aquí hasta el final del estudio.

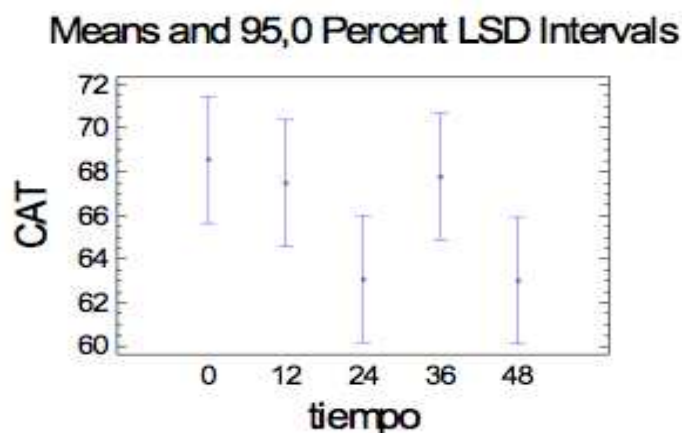
## RESULTADOS

Figura 2.2. Concentración de MDA en leche humana: evolución longitudinal. Leche fresca (0h) y leche mantenida a 4° durante 12h, 24h, 36h y 48h. Intervalos para la media. Test LSD.



Al igual que los parámetros anteriormente evaluados, la CAT obtenida en leche fresca presentó una amplia variabilidad, con valor máximo de 90,95 y mínimo de 39,45, siendo la mediana 73,80. Como puede comprobarse en la tabla 2.1, la determinación de la capacidad antioxidante global de la leche humana presenta una gran variabilidad en todas las poblaciones analizadas. El análisis estadístico multifactorial indica variaciones significativas entre las mujeres donantes ( $p = 0.0000$ ), sin embargo no los son en relación al tiempo de almacenamiento (NS), indicando que la capacidad antioxidante global permanece sin cambios significativos desde el inicio, leche fresca hasta el final del estudio, tras refrigeración durante 48 horas, tal como muestra la figura 2.3.

Figura. 2.3 Capacidad antioxidante total de leche humana ( CAT, moles equivalentes de Trolox): evolución longitudinal. leche fresca (0h), y leche refrigerada a 4°C durante 12h, 24h, 36h y 48 h. Intervalos para la media. Test LSD



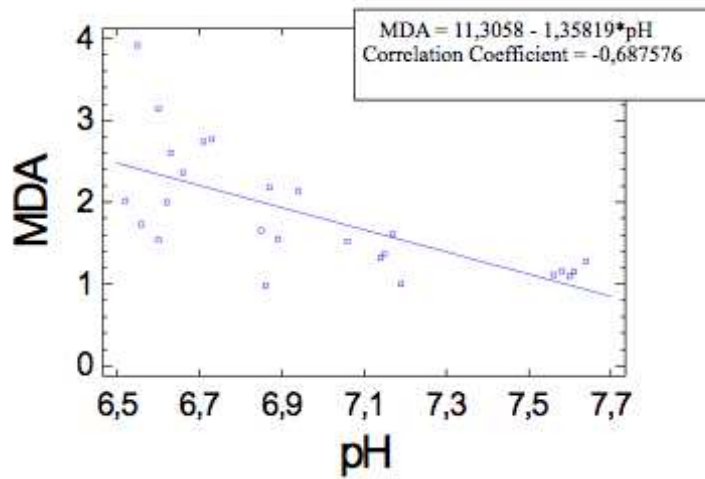
La posible relación entre los parámetros evaluadores de la capacidad antioxidante de la leche y el pH de la misma se analizó por aplicación de un análisis de regresión lineal.

Los resultados encontrados no mostraron relación significativa entre el pH y la CAT en leche humana. Sin embargo, el descenso en el pH sí se relaciona, inversamente, con la concentración de MDA según la siguiente ecuación:

$$\text{MDA} = 11,3058 - 1,35819 \cdot \text{pH}$$

En la figura 2.4 se muestra la representación del análisis de regresión lineal entre los valores de pH y MDA obtenidos en la evolución longitudinal en leche humana refrigerada. El coeficiente de correlación del análisis ( $R = -0,6876$ ) indica que entre ambas variables existe una relación inversa de fuerza moderada. Pudiendo afirmar que dicha relación entre ambos parámetros es altamente significativa, con intervalo de confianza del 95%, ( $p = 0,0001$ ).

Figura 2.4 Correlación entre concentración de MDA y pH en leche humana: evolución longitudinal en refrigeración a tiempo 0h, 12h, 24h, 36h y 48 h.



**III. Human milk bactericidal properties: effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components**

Efecto del método de conservación sobre el recuento bacteriano

La Tabla 3.1 muestra los resultados obtenidos en los análisis microbianos de microorganismos aeróbicos mesofílicos, *S. aureus*, *S. epidermidis* y *Enterococcus spp.*, en las muestras congeladas a -20°C, muestras congeladas a -80°C, y muestras congeladas a -80°C con liofilización subsiguiente.

*Tabla 3.1 Recuentos microbianos en LH congelada a -20°C, -80°C y liofilizada.*

	-20°C		-80°C		Liofilización	
	Recuento microbiano	%	Recuento microbiano	%	Recuento microbiano	%
<b>Microorganismos aeróbicos mesofílicos</b>	29690 ± 9830* (90-4,100,000)	85	24065 ± 2500*^ (270-101,000)	100	15107 ± 281^ (270-101,000)	95
<b>S. aureus</b>	1171 ± 1010* (200-3200)	70	2950 ± 730* (100-13000)	60	611 ± 90* (14-2300)	70
<b>S. epidermidis</b>	14443 ± 1290* (2410-47,000)	80	7057 ± 480* ^ (260-24300)	85	5154 ± 310 (760-16700)	70
<b>Enterococcus spp</b>	99202 ± 6090 (280-202000)	20	807 ± 60 (200-1460)	20	488 ± 70 (300-620)	25

Resultados expresados como media ± desviación estándar (n= 20x3) UFC/ml.

\* indica distribución no normal. ^indica diferencia estadísticamente significativa (p<0.05) respecto a congelación a -20°C

## RESULTADOS

El test de Kruskal-Wallis, prueba no paramétrica que indica las diferencias en poblaciones no normales, se utilizó para valorar el efecto del método de conservación sobre los recuentos de cada una de las especies microbianas indicando que la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  y la liofilización resultaron en diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los recuentos de microorganismos aeróbicos mesofílicos y *S. epidermidis*. Específicamente, la liofilización disminuyó significativamente los recuentos de ambos grupos de organismos, mientras que la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  sólo afectó a *S. epidermidis*, con una disminución en el conteo respecto a la línea de base. Ni *S. aureus* ni *Enterococcus* spp. mostraron diferencias significativas en los recuentos ni en las muestras liofilizadas ni en las congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$  comparándolas con los correspondientes recuentos en las muestras almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Efecto del método de conservación en la capacidad bactericida de la leche.

Todas las muestras analizadas mostraron capacidad bactericida. La Tabla 3.2 muestra la capacidad bactericida de las muestras congeladas a  $-20^{\circ}$ , a  $-80^{\circ}\text{C}$  y a  $-80^{\circ}\text{C}$  seguido de liofilización. Se confirmó la distribución normal en todos los casos.

Tabla 3.2. Capacidad bactericida de la LM congelada a  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$  y liofilizada.

	Media $\pm$ DE	Rango efecto bactericida
<b>Congelación a <math>-20^{\circ}\text{C}</math></b>	63,60 $\pm$ 13,75	38,24 - 91,62
<b>Congelación a <math>-80^{\circ}\text{C}</math></b>	69,15 $\pm$ 21,13	32,06 - 98,57
<b>Liofilización</b>	63,09 $\pm$ 21,61	21,88 - 94,85

Resultados expresados como media  $\pm$  DE (n=20) de la inhibición de *E.coli* (%) respecto al control.

El análisis con ANOVA multifactorial para investigar si la naturaleza de las muestras de LM o el método de conservación de la LM influyeron en la capacidad bactericida no mostró diferencias significativas atribuibles a las donantes o el método de conservación empleado. La liofilización de la LM no produce pérdidas significativas en la capacidad bactericida.



Efecto de los factores maternos (edad gestacional y tiempo postparto) en la capacidad bactericida de la leche.

Se analizó la posible relación entre las propiedades de la LH (tiempo postparto y edad gestacional) y su capacidad bactericida. La tabla 3 refleja la capacidad bactericida correspondiente a la etapa inicial de la lactancia y la leche madura, y la LH de madre de RNT y de RNP. La distribución fue normal en todos los casos.

*Tabla 3.3. Capacidad bactericida en función de la etapa de la lactancia: inicial o leche madura, y del momento del parto: pre término o a término.*

	Media ± DE	n	Rango efecto Bactericida
<b>Calostro</b>	66,90 ± 15,19*	20	44,12 -88,71
<b>Leche madura</b>	75,38 ± 11,94	37	52,28-96,57
<b>Parto pretérmino</b>	64,39 ± 15,61#	27	37,50-92,81
<b>Parto a término</b>	73,43 ± 12,90	25	47,31-90,90

Resultados expresados como media ± DE de la reducción del crecimiento de E. coli comparado con el control. \*Indica diferencias estadísticas ( $p < 0.05$ ) respecto a la leche madura. # Indica diferencia estadística ( $p < 0.05$ ) respecto a las muestras de madre con parto pretérmino.

Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) tanto para el tiempo postparto y la edad gestacional. De hecho, las muestras de leche madura tenían mayor capacidad bactericida que el calostro, y las muestras de madres con partos a término tuvieron mayor capacidad bactericida que las de madres con parto prematuro.

Relación entre la capacidad bactericida y la composición nutricional de la leche.

Se analizó la relación entre la capacidad bactericida de la LH y su contenido en grasa, proteínas y lactosa en 30 muestras. La capacidad bactericida media de esas muestras, expresada como el porcentaje de inhibición de crecimiento de E. coli fue  $63.60 \pm$

## RESULTADOS

13.75 %. Este valor se encuentra en el mismo rango obtenido en los demás apartados del estudio

Las concentraciones medias ( en g/100 mL) de grasa, proteínas, y lactosa de las muestras fueron  $3.45 \pm 1.80$ ,  $1.07 \pm 0.54$  and  $6.90 \pm 0.39$ , respectivamente.

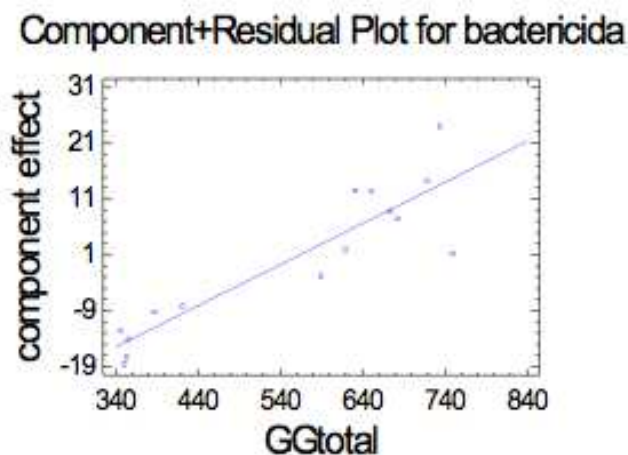
El análisis de regresión múltiple usando la capacidad bactericida de las muestras como variable dependiente y la concentración de los tres macronutrientes mencionados como variables independientes no reveló ninguna relación significativa para ninguno de ellos ( $p > 0.05$ ).

### Relación entre la capacidad bactericida y el contenido en gangliósidos y ácido siálico de la leche.

El estudio de la relación entre la capacidad bactericida y los componentes funcionales se llevó a cabo en 15 muestras. Su capacidad bactericida media fue  $70.83 \pm 25.08$  %. La concentración media de ácido siálico y gangliósidos totales fue  $230.00 \pm 22.10$  mg/l y  $550.80 \pm 160.00$   $\mu$ g/l, respectivamente.

El análisis de regresión múltiple de la relación entre la capacidad bactericida de la leche y su contenido total en gangliósidos y ácido siálico reveló una correlación significativa ( $p = 0.0000$ ). La relación significativa se obtuvo con el contenido total de GG. Ni la concentración de ácido siálico, ni la concentración de ninguno de los componentes parciales de la fracción de GG (GM3, GD3, GT3) mostraron relación significativa.

*Figura 3.2 Relación entre el efecto bactericida y contenido total en gangliósidos, coeficiente de correlación de  $r^2 = 0.8475$*





# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

La optimización de la nutrición de los RNP, especialmente los de mayor riesgo como los de MBPN, constituye una prioridad asistencial actual, y ha fomentado un intenso desarrollo de la investigación en este campo. Partiendo de la evidencia de la superioridad de la LM, demostrada en numerosos estudios, hoy la investigación se enfoca en la preservación de sus propiedades cuando se requiere una manipulación previa a la ingesta y para una correcta suplementación. En un futuro, posiblemente, los conocimientos en ingeniería genética y de procesos se aplicarán a la LHD y los BLH para poder proporcionar la LHD que más se ajuste a las necesidades de cada RNP.

### **1) Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk.**

En el primer estudio queda demostrado que los métodos automatizados de análisis de LH son una interesante opción por sus ventajas prácticas pero también que la calibración periódica es necesaria para la extrapolación de los resultados al campo clínico.

Las ventajas que ofrece el uso del HMA son: (1) precisar un pequeño volumen de muestra de leche; (2) mínimo entrenamiento del personal que realiza el análisis; (3) el equipo es fácilmente transportable y precisa un pequeño gasto de reactivo; (4) su rapidez que permite disponer del resultado en un minuto. El estudio apoya dichas ventajas y sugiere que este método puede ser fácilmente incorporado a los BLH para el análisis de rutina de la LHD o a la cabecera del paciente para el análisis de la leche de madre propia. Utilizando un volumen de muestra de <2ml y en sólo 1 minuto, el HMA puede determinar la concentración de los tres principales nutrientes ( lípidos, proteínas y lactosa) y calcular el valor calórico correspondiente. Además, el uso de un único instrumento reduce considerablemente los consumibles necesarios y la formación de los técnicos. En comparación, las técnicas convencionales de laboratorio precisaron un volumen total de 25 mL, con duración de aproximadamente 150 minutos y entrenamiento prolongado de los técnicos para cada método.

Para la evaluación de la validez del análisis de los nutrientes de la leche por HMA se seleccionan los métodos oficiales establecidos para determinación de grasa (método Gerber)(148), lactosa (método de la cloramina T)(149), mientras que para la determinación de proteínas se desestimó el método oficial (Kjendhal)(153), dado el elevado con-

## DISCUSIÓN

---

tenido de nitrógeno no proteico en leche humana, eligiendo el método Bradford para este fin (151).

De forma inicial, se eligió para cuantificar el contenido graso total el método de Röse Gottlieb recomendado por la Federación Internacional Dairy para la cuantificación de grasa total ([http://nmpf.org/washington\\_watch/labeling/international](http://nmpf.org/washington_watch/labeling/international)). Debido a que en los test preliminares se formaron emulsiones de grasa y reactivos con frecuencia, se optó por utilizar el método Gerber para evitar este inconveniente (148).

Los resultados obtenidos concuerdan con los de otros autores (154-157): se han encontrado diferencias significativas en la concentración de macronutrientes entre los métodos tradicionales y HMA. Así, el método de Gerber para la cuantificación de la grasa en la leche mostró concentraciones significativamente menores que el método HMA. Ambas técnicas mostraron la esperada variabilidad inter individual inherente a la LH, y las concentraciones obtenidas con ambos procedimientos se encontraron entre los rangos publicados para concentraciones de lípidos en LM (109,158-160). Aunque las diferencias obtenidas fueron estadísticamente significativas, se observó una buena correlación entre los datos, sugiriendo que las diferencias podrían ser obviadas reajustando la calibración del analizador. Otros autores han obtenido resultados similares, comparando el analizador con otros métodos bioquímicos (métodos de Folch y Röse Gottlieb, respectivamente) (154,155). Reciente y posteriormente a la publicación de este trabajo, Fusch ha publicado resultados de la comparación de dos instrumentos que utilizan técnica de infrarrojos (Near-infrared milk analyzer (Unity SpectraStar, USA) and Mid-infrared milk analyzer (Miris, Sweden) con micrométodos para determinación de macronutrientes (Mojonnier, análisis elemental y UPLC-MS/MS para grasa proteínas y lactosa respectivamente). El amplio tamaño muestral y representatividad de las muestras otorgan gran relevancia a sus resultados (157)(67). No hubo diferencias significativas entre las determinaciones de grasa mediante método de referencia y el Miris HMA, sí con los resultados obtenidos con el otro instrumento, y la correlación fue buena.

Las concentraciones de proteínas obtenidas con ambos métodos mostraron diferencias importantes del orden de 0.59 g/100mL pero con diferencias de hasta 1.23 g/100 mL en alguna de las muestras. Esta llamativa diferencia es un elemento preocupante ya que el contenido proteico es el más relevante para fortificar la LH. El análisis de estas diferencias muestra que el método Bradford obtiene resultados significativamente mayores que el HMA en todas las muestras. La correlación lineal entre las dos técnicas fue baja. Co-

mo se ha ratificado en este estudio, la concentración de proteínas en la LH es generalmente más estable que la de lípidos. En este sentido, la DS fue baja y similar en ambos métodos pese al hecho de que la concentración media obtenida mediante el método de Bradford doblaba la obtenida mediante el HMA. Las concentraciones obtenidas con el autoanalizador estaban muy por debajo de lo esperado según lo documentado en la literatura (109,161) mientras que el método de Bradford obtuvo resultados dentro del intervalo esperado. Por tanto, en ausencia de muestras certificadas de LH y considerando los parámetros obtenidos con los dos métodos, parece razonable recomendar el ajuste y calibración del HMA antes de utilizarlo para la cuantificación del contenido proteico. Otros autores han conducido estudios similares utilizando la misma u otra técnica (Bradford, Kjeldahl,) (154,155). Menjo (2009) encuentra también una infraestimación de las proteínas (154) y Casadio también describe diferencias significativas, aunque en este caso el autoanalizador HMA sobrestimó la concentración de proteínas en LH, opuestamente a nuestros resultados (155). Fusch encuentra una infraestimación media de 0.2 g/100 ml en el contenido proteico analizado con el HMA frente los métodos de referencia (157). Las diferencias obtenidas en los diferentes trabajos pueden tener su origen en las diferentes técnicas de laboratorio empleadas, y en la particular composición de la leche materna con un contenido de nitrógeno no proteico más elevado que la leche bovina.

La concentración de lactosa mostró diferencias significativas, con concentraciones menores en todas las muestras analizadas mediante el HMA, con valores próximos a 5g/100 mL. Por tanto, el HMA parece infraestimar la concentración de lactosa publicada en LH (161,162). En contraste, el método de laboratorio obtuvo valores coincidentes con los esperados para la LH, un dato que refuerza su fiabilidad. Además de lactosa, la cuantificación mediante el método de Chloramine-T puede incluir otros azúcares como los oligosacáridos con terminales lactosa, que pueden estar presentes en cantidades grandes y variables en la LM (162). Menjo (154) también encuentra diferencias significativas en las determinaciones de lactosa comparando método HMA con cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) particularmente en las muestras diluidas. La dilución de las muestras no está contemplada en las instrucciones del instrumento y dado el volumen de la muestra (1ml) no es un aspecto relevante en la práctica clínica. Fusch (2015) encuentra una pobre correlación en las determinaciones de lactosa obtenidas mediante los métodos basados en infrarrojos, que están infraestimadas comparándolas con las obtenidas por métodos de referencia (157).

## DISCUSIÓN

---

Se obtuvo una elevada precisión y linealidad durante la validación tanto de los ensayos bioquímicos seleccionados como del HMA para determinar los macronutrientes, lo que permite la comparación crítica de ambos métodos. Las limitaciones incluyen el pequeño tamaño muestral y la pérdida de algunas observaciones debido a la falta de volumen suficiente para completar todas las determinaciones en cada muestra.

El uso de los autoanalizadores por infrarrojo, como el HMA, parece ser más apropiados como métodos de rutina en unidades de neonatología y BLH. Sin embargo, se debe revelar que se requiere una frecuente calibración con un standard altamente fiable, si se utiliza con la finalidad de fortificar la LH administrada a RNP. Recientemente y posteriormente a este estudio el grupo de Billard ha planteado una estrategia de calibración del HMA (163). Aunque la influencia teórica de analizar la LH previamente a la FLH es positiva, son necesarios más estudios evaluando los beneficios sobre el pronóstico nutricional de incorporar a los protocolos de nutrición de RNPT el análisis de rutina de la LH y la LHD.

II) “Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal”.

Cuando la administración de LH a los RNP o enfermos no puede realizarse en las condiciones ideales, directamente del pecho de la madre, es necesario la extracción y conservación en refrigeración previa a su ingesta.

Las condiciones y período de conservación en frío deben optimizarse para minimizar su alteración y las pérdidas de sus cualidades. Entre las propiedades que interesa preservar destaca la capacidad antioxidante, como factor de protección frente a patologías propias del RN, especialmente RNP a las que está especialmente expuesto, dada su inmadurez, de órganos y sistemas. El estrés oxidativo, mediante la formación de radicales libres y derivados reactivos del oxígeno es un factor etiológico de patología neonatal grave como la DBP, ECN y ROP grave (132-134).

Diversos autores han evaluado previamente la estabilidad de esta propiedad de la LH durante su manipulación, sin embargo sus resultados no son concluyentes, ni en muchas ocasiones contrastables entre ellos, por considerar diversas condiciones de almacenamiento o evaluar parámetros diferentes (104,164-6).



Es difícil seleccionar un parámetro evaluador de la propiedad antioxidante de la LH; los diferentes autores que la han estudiado han utilizado diferentes índices (componentes independientes, actividades enzimáticas, productos de oxidación o capacidad global antioxidante, entre otros). La elección de la concentración de MDA, como evaluador del estado oxidativo de la leche, se justifica no sólo 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.

Estudios anteriores han mostrado la presencia de MDA en LH recién extraída y su incremento significativo cuando se almacena 48 horas (104), sin embargo se desconocía la evolución de este aumento y a partir de qué tiempo se producía.

Los resultados obtenidos en este estudio han corroborado la presencia de MDA en todas las muestras frescas analizadas, con baja variabilidad entre ellas, posible consecuencia de la selección de las donantes entre mujeres no fumadoras, ya que estudios previos han demostrado la diferente concentración de MDA entre mujeres fumadoras y no fumadoras (166).

Como puede observarse en la figura 2.2 el contenido de MDA en leche fresca es mínimo, a partir de aquí el tiempo de almacenamiento conlleva un incremento, suave en las primeras 24 horas, a partir de las cuales la concentración de MDA muestra un marcado aumento con significación estadística, así, a las 36 horas de almacenamiento la concentración de MDA es significativamente mayor, manteniéndose estable a partir de aquí. Este resultado coincide y completa el obtenido en estudios anteriores (104), corroborando la inestabilidad de la leche, respecto a la concentración de MDA tras almacenamiento 48 horas en refrigeración pero detallando, además, que esta alteración se produce en etapas previas, concretamente a las 36 horas, siendo estable hasta este momento.

El estudio de la capacidad antioxidante de la leche se completa con la evaluación de la capacidad antioxidante global de la leche. En este parámetro confluye la contribución de esta propiedad de numerosos componentes de la leche, algunos identificados y considerados en trabajos de otros autores, como glutathion (GSH) (164), enzima glutathion peroxidasa (167,168), enzima superóxido dismutasa (168) y vitaminas antioxidantes C, A y E, entre otros. Este parámetro ha sido anteriormente utilizado para determinar la capacidad antioxidante total por otros autores (104) en otros estudios en LH. Los resul-

## DISCUSIÓN

---

tados obtenidos presentan una gran variabilidad entre las mujeres donantes, estas variaciones posiblemente puedan estar enmascarando el efecto de los otros factores influyentes, como la permanencia a 4°C. Así, en este trabajo no se han encontrado variaciones significativas en el poder antioxidante total de la leche durante las 48 horas de almacenamiento. Este resultado puede ser debido a la propia variabilidad entre muestras, que enmascare otros factores que afecten como pueda ser el estudiado, lo que explicaría la discrepancia con otros autores. Este resultado discrepa, o al menos no era esperable dado el conocido efecto que la permanencia de la LH en estas condiciones tiene sobre la estabilidad y actividad de algunos de los compuestos con acción antioxidante, contribuyentes a esta propiedad (165, 167, 175, 170).

Posteriormente a la publicación del artículo varios autores han estudiado la estabilidad de la capacidad antioxidante total durante la conservación de la leche humana con interesantes y diferentes resultados. Aksu (171) recientemente ha descrito una disminución de la CAT del 50% en refrigeración durante 72 horas y tras congelación a -20°C. La congelación a -80°C parece preservar mejor la capacidad antioxidante ya que no se altera tras 3 meses a -80°C (172). Estos resultados difieren de los publicados recientemente por Bertino (2013)(91), que no encuentra alteraciones en la CAT ni en el MDA en LM refrigerada durante 96 horas.

La acidez de la leche es un parámetro de control de calidad muy valorado en la industria láctea, y utilizado en algunos BLH, como parámetro limitante para su empleo. Se valora como acidez (expresada como concentración de ácido láctico) y pH. Sin embargo, para el control rutinario en empresa láctea, y también en BLH, se recurre a la acidez dórnica (173).

Es conocida la caída del pH de leche humana durante su almacenamiento (170,171) tanto si el almacenamiento se realiza en refrigeración como en congelación. En este trabajo se han obtenido resultados concordantes con dichos estudios. En leche fresca se han encontrado pH entre 7,07 y 7,68, valores máximo y mínimo ( $7,50 \pm 0,16$  como media), datos ligeramente superiores a los publicados previamente (172) e incluidos en el intervalo obtenido por otros autores (171). Cuando la leche se almacena en frío, desde el inicio se aprecia una marcada y significativa disminución del pH, así a las 24 horas de almacenamiento el pH medio es de  $7,09 \pm 0,22$ , habiendo pues descendido -0,41 unidades, respecto al valor inicial. El trabajo publicado por Hedge (2007), realiza el seguimiento del pH durante este periodo, mostrando similar comportamiento del pH aunque

con menor pendiente de descenso (-0,17 unidades de pH de diferencia) entre leche refrigerada 24 h y leche fresca (171). Resultados así mismo concordantes con otros autores (161,170). Nuestro estudio prolonga el periodo de almacenamiento durante más tiempo, observando que la caída de pH se mantiene en descenso durante todo el periodo evaluado, alcanzando el mínimo valor ( $6,70 \pm 0,19$ ) a las 48 h. Igualmente este descenso de pH se prolonga en otros estudios hasta tiempos más largos como 8 días de refrigeración (168).

Así, estos resultados confirman que el almacenamiento afecta a la acidez de la leche; aumentando su acidez desde el inicio de su refrigeración, tanto más cuanto mayor es el tiempo de mantenimiento.

Al margen de la relación que el aumento de la acidez de la leche pueda mantener con el desarrollo de microorganismos, relación valorada en algunos estudios (171), el aumento de acidez desencadenado durante la refrigeración tiene su origen en el incremento de ácidos grasos libres que conlleva la actividad de las enzimas lipasas presentes en la leche y activas a pesar de las bajas temperaturas, incluso en congelación (a  $-20^{\circ}\text{C}$ ) (172). La actividad lipasa es mayor y con ello el descenso de pH si la leche se almacena a temperatura ambiente entre 15 a  $25^{\circ}\text{C}$ ; a su vez, a estas temperaturas es más prolífero el crecimiento microbiano (173).

Posteriormente Bertino E (91) ha analizado la actividad lipasa y perfil lipídico durante la refrigeración de la LM durante 96 horas encontrando disminución progresiva del pH h no acompañada por aumento en los ácidos grasos libres.

El aumento de ácidos grasos libres, especialmente insaturados, registrado en diversos trabajos (162,174), puede llevar a un aumento del proceso oxidativo y con ello la formación de productos de oxidación como MDA. En base a ello, en este trabajo se ha tratado de relacionar las variaciones entre ambos parámetros: pH y concentración de MDA, no habiendo encontrado estudios previos que traten de relacionarlas. Los resultados obtenidos confirman una relación lineal inversa entre ambas con fuerte significación estadística, de forma que el descenso de pH conlleva un aumento en la concentración de MDA.

Sin embargo no se ha encontrado relación entre la variación del pH con la capacidad total antioxidante, aunque este resultado parece poco concluyente dada la elevada variabilidad interindividual de la CAT, lo que impide sacar conclusiones al respecto y precisa, para su confirmación, nuevos estudios con mayor número de muestras.

## DISCUSIÓN

---

Si bien con la pasteurización se lograría inactivar las enzimas lipasas, desencadenantes de la liberación de ácidos grasos, paralelamente se destruiría toda la flora bacteriana, las células vivas, y disminuirían significativamente otros factores bioactivos relevantes para los beneficios de la LH. Por ello es tan importante optimizar el tratamiento para lograr la seguridad microbiológica sin afectar a las propiedades beneficiosas.

Los resultados obtenidos permiten recomendar que con la finalidad de evitar las alteraciones en el componente lipídico, el almacenamiento en refrigeración no debe superar las 36 horas.

III) Human milk bactericidal properties: effect of lyophilization and relation to maternal factors and milk components.

Una de las características de la LH es que no es un producto estéril. El uso de métodos independientes de cultivo ha permitido identificar y clasificar específicamente las bacterias presentes en la LH, siendo los microorganismos más frecuentes: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* and *Leuconostoc* (178-180).

La microbiota de la LH tiene potenciales beneficios sobre la salud del lactante: favorece la maduración del sistema inmune, contribuye a la reducción de la incidencia y severidad de las infecciones y promueve el establecimiento de un microbioma saludable en su intestino. En los BLH, con la finalidad de asegurar la seguridad de la LHD, ésta se somete a pasteurización que conlleva la eliminación no sólo de virus sino también de la flora bacteriana, con la excepción de bacterias productoras de esporas termorresistentes.

Los efectos de diferentes condiciones de congelación sobre la calidad microbiológica de la LH son conocidos aunque no se han realizado estudios del efecto global de los sucesivos pasos de congelación. Del mismo modo, no se han encontrado estudios previos sobre los efectos de la liofilización sobre la calidad microbiológica como método de almacenamiento en los BLH.

El objetivo de este trabajo ha sido comparar el efecto de la liofilización con los métodos de conservación habituales, congelación a diferentes temperaturas, en términos de recuentos bacterianos. Los microorganismos mesófilicos y *Staphylococcus* (*S. epidermidis* and *S. aureus*) fueron los microorganismos más frecuentemente identificados, mientras que el género *Enterococcus* se aisló sólo en el 20% de las muestras analizadas. *Staphylococcus* y *Streptococcus* se han descrito como la flora predominante en leche

fresca, y sus recuentos no varían cuando la leche se congela a  $-20^{\circ}\text{C}$  por períodos de 3 días a 6 meses (178). Esto sugiere que la congelación de nuestras muestras de referencia a  $-20^{\circ}\text{C}$  no debería haber alterado el recuento de dichos géneros.

La conservación subsiguiente de las muestras a  $-80^{\circ}\text{C}$  o liofilizadas resultó en un descenso en los recuentos de *S. epidermis* en ambos casos. La cantidad de microorganismos mesofílicos aeróbicos no se modificó por la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ , pero disminuyó significativamente en las muestras liofilizadas comparadas con los valores de referencia y las muestras congeladas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ni *S. aureus* ni *Enterococcus* mostraron diferencias significativas tras la liofilización o la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Desde una perspectiva microbiológica, la liofilización se presenta como una buena alternativa para la conservación de la LH, con efectos similares a la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  sobre la carga microbiana del producto.

Aspectos estudiados:

#### A) Estabilidad de la capacidad bactericida

Los resultados obtenidos corroboran la actividad bactericida de la LH frente a *E. coli* en las muestras de referencia, previamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ , expresadas como porcentaje de inhibición de crecimiento bacteriano. En este estudio la capacidad bactericida media de las muestras antes de la congelación a  $-80^{\circ}$  o la liofilización fue inferior que la capacidad publicada para leche fresca en estudios previos (78,181,182). Las diferencias entre éstos resultados y los encontrados en la literatura pueden explicarse por la posible pérdida de componentes bioactivos durante la congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  (181,183,184).

Las muestras de leche del estudio se conservaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  entre 1-6 semanas antes del primer análisis, con el fin de semejar el proceso lo más posible a las prácticas rutinarias en el BLH; es posible que esta congelación previa y común a todas las muestras sea la causa de la pérdida parcial de esta propiedad, en relación a otros previos. Así, los resultados obtenidos confirman la presencia de propiedades bactericidas en la LHD almacenada en el BLH, pese al descenso en relación a la leche fresca.

No se han encontrado estudios sobre los efectos adicionales de los tratamientos sucesivos habitualmente empleados en los BLH, congelación inicial en el domicilio a  $-20^{\circ}\text{C}$  seguido de congelación en el BLH a  $-20$  o  $-80^{\circ}\text{C}$ . Asimismo tampoco se han encontrado estudios en la literatura comparando los efectos de la liofilización y la congelación sobre las propiedades microbiológica en la LH en los BLH.

Los resultados confirman la existencia de capacidad bactericida en todas las muestras de LH, con valores que difieren ampliamente entre donantes. La capacidad inhibitoria de crecimiento de *E. coli* permaneció estable independientemente del método de conservación empleado. La congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  durante el período de tiempo estudiado no afectó a la capacidad bactericida y la liofilización de la leche asimismo no llevó cambios comparada con la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  o los valores de referencia. Así, la liofilización preserva la capacidad antioxidante de la LH de forma equiparable a como lo hace la congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### B) Factores influyendo en las características de la LH

La variabilidad es una característica de la LH, dado que sus componentes y propiedades están determinados por un amplio abanico de factores. Se han realizado estudios exhaustivos sobre el efecto del tiempo postparto en la composición en nutrientes, aunque la variación en biocomponentes y propiedades no son tan bien conocidas. En este estudio se ha encontrado que tanto el tiempo postparto y la edad gestacional ejercen una influencia significativa en la capacidad bactericida de la LH. Específicamente, las propiedades bactericidas fueron menores en la primera semana de lactancia y aumentaron en la leche madura. Este hallazgo es sorprendente, dado que una de las características más valiosas del calostro es la contribución a las defensas del RN. Algunos autores han analizado este efecto previamente y los resultados no son siempre concordantes. Takci *et al.* (183) no observaron diferencias en la capacidad bactericida de la LH frente a *E. coli* durante los primeros 15 días de lactancia, mientras que, en contraste Ogundele (170) publicó un marcado descenso en la capacidad bactericida durante el período desde el calostro a la leche de transición. Otros estudios han analizado los cambios en ciertos componentes individuales que contribuyen al efecto global con la observación de diferentes tendencias (185-189).

Los resultados de este estudio confirman que la capacidad bactericida de la leche frente a *E. coli* es menos pronunciada en la leche de madres con niños prematuros que en aquellas con niños RNT. No se han encontrado estudios en la literatura con los que hacer comparaciones en este aspecto, aunque algunos autores han examinado el efecto que la gestación puede tener en ciertos componentes probablemente activos en esta característica como las proteínas, lípidos, enzimas o alfa-tocoferol (188,189). Sin embargo, ningún estudio ha examinado el efecto global.

Aunque se han identificado algunos de los componentes bioactivos de la LH, su naturaleza química varía e incluye lípidos, proteínas, e hidratos de carbono, englobando éstos últimos a los oligosacáridos, que son potencialmente activos en proteger al RN de infecciones)(190,191). Sin embargo, no está clarificada la relación directa entre cada uno de esos componentes y la protección global antibacteriana proporcionada por la LH.

La concentración de los nutrientes: proteínas, grasa y lactosa mostraron amplia variabilidad, dentro del intervalo aceptado en la literatura. No se encontró que ninguno de los tres nutrientes guardara relación significativa con la capacidad bactericida de la LH y su contenido.

Los gangliósidos, en sus diferentes formas activas que constituyen el componente total, y los derivados de ácido siálico son componentes activos presentes en la LH que intervienen en muchos procesos biológicos y en el desarrollo y maduración del sistema inmune (192). Las concentraciones de las diferentes especies de gangliósidos y ácido siálico varían ampliamente entre diferentes muestras de leche, y los factores subyacentes a dicha variabilidad no se han establecido con claridad (192-195). Los mecanismos de acción de estos componentes sugieren que pueden contribuir a la capacidad antibacteriana de la leche.

El análisis de regresión mostró que los efectos bactericidas se correlacionaban directamente con la cantidad total de gangliósidos presentes en la LH ( $p = 0.039$ ;  $r = 0.896$ ) sin que ningún componente individual de la fracción de gangliósido contribuyera de forma significativa. Según nuestro conocimiento, ningún estudio ha analizado previamente la relación entre la capacidad bactericida de la LH y la composición de la fracción de gangliósidos. Por tanto, no es posible comparar nuestros resultados con los de otros autores. Sin embargo, sí se ha estudiado el efecto bactericida de los esfingolípidos de la leche bovina, que comparten parte de la estructura de los gangliósidos. Sprong *et al.* (200) observaron el efecto inhibitorio en el crecimiento bacteriano de los esfingolípidos presentes en la leche bovina, sugiriendo que los gangliósidos están muy implicados en la acción bactericida observada con esta fracción. Los ácidos grasos que forman parte de la fracción ceramida de los gangliósidos pueden conferir esta potente actividad bactericida, tal como se ha observado *in vitro*, sin que la cadena de azúcar estuviera envuelta en este efecto. Los ácidos grasos mencionados podrían ser, de hecho, los componentes activos de la fracción lipídica descritos por Ogundele (170).

La capacidad bactericida es una de las propiedades funcionales de la leche que interesa preservar aunque ésta se someta a conservación y procesamiento. No se ha en-

## DISCUSIÓN

---

contrado relación directa entre la composición en macronutrientes y dicha propiedad, pero sí con los gangliósidos, que se postulan como uno de los componentes de la LH que participan de dicho efecto beneficioso. La liofilización no disminuye la capacidad bactericida, y tampoco aumenta la carga microbiana, por lo que, desde este punto de vista, puede considerarse una opción válida de conservación de la LH en los BLH.







# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. Los autoanalizadores por infrarrojo como el HMA, ofrecen importantes ventajas frente a los métodos tradicionales para la determinación de nutrientes en leche humana. El menor volumen de muestra que se precisa, la sencillez de uso y la rapidez en la obtención de resultados les capacita como adecuados métodos para el uso rutinario en unidades de neonatología y en los bancos de leche humana.
2. Las determinaciones de los tres macronutrientes mostraron diferencias significativas con los métodos de referencia, siendo la correlación significativa. Lo que sugiere que la calibración rutinaria con un standard altamente fiable es obligatoria, si se utiliza con la finalidad de fortificar la leche humana destinada a recién nacidos prematuros.
3. La refrigeración de la leche humana no disminuye su capacidad antioxidante total, aunque sí se detecta un aumento de malondialdehído, habitual marcador de peroxidación lipídica, a partir de las 36 horas. Con el fin de preservar el estado oxidativo de la leche humana, se recomienda su congelación, cuando no vaya a ser consumida en las primeras 36 horas.
4. En base a la calidad microbiológica de la leche humana, la liofilización puede ser un buen método para su conservación en los bancos de leche humana. Los resultados obtenidos indican que la liofilización no aumenta la carga microbiana y que la capacidad bactericida de la leche humana liofilizada se preserva.
5. No se ha establecido correlación entre la capacidad bactericida de la leche humana y el contenido en macronutrientes. Sin embargo, sí se ha encontrado relación significativa entre la capacidad bactericida y el contenido total en gangliósidos, que se postulan como uno de los componentes de la leche materna implicados en dicha propiedad beneficiosa.





**BIBLIOGRAFÍA**



---

**BIBLIOGRAFÍA**

1. American Academy of Pediatrics. Section on Breastfeeding. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* 2012; 129(3): 827-841.
2. Khan J, Vesel L, Bahl R, Martines JC. Timing of breastfeeding initiation and exclusivity of breastfeeding during the first month of life: effects on neonatal mortality and morbidity-a systematic review and meta-analysis. *Matern Child Health J.* 2015;19(3):468-79.
3. Hauck FR, Thompson JMD, Tanabe KO, Moon RY, Vennemann MM. Breastfeeding and reduced risk of sudden infant death syndrome: a meta-analysis. *Pediatrics* 2011;128(1):1-8.
4. Chen A, Rogan WJ. Breastfeeding and the risk of postneonatal death in the United States. *Pediatrics* 2004;113(5):e435-9.
5. Jones G, Steketee RW, Black RE, Bhutta ZA, Morris SS. Bellagio Child Survival Study Group. How many child deaths can we prevent this year? *Lancet* 2003;362(9377):65-71.
6. Duijts L, Jaddoe VW, Hofman A, Moll HA. Prolonged and exclusive breastfeeding reduces the risk of infectious diseases in infancy. *Pediatrics*. 2010;126:e18-25.
7. Quigley MA, Kelly YJ, Sacker A. Breastfeeding and hospitalization for diarrheal and respiratory infection in the United Kingdom Millennium Cohort Study. *Pediatrics* 2007;119(4):e837-42.
8. Chantry CJ, Howard CR, Auinger P. Full breastfeeding duration and associated decrease in respiratory tract infection in US children. *Pediatrics* 2006; 117(2): 425-432.
9. Nishimura T, Suzue J, Kaji H. Breastfeeding reduces the severity of respiratory syncytial virus infection among young infants: a multi-center prospective study. *Pediatr Int.* 2009;51(6):812-816.
10. Parikh NI, Hwang SJ, Ingelsson E, et al. Breastfeeding in infancy and adult cardiovascular disease risk factors. *Am J Med.* 2009;122(7):656-663.
11. Metzger MW, McDade TW. Breastfeeding as obesity prevention in the United States: a sibling difference model. *Am J Hum Biol.* 2010;22(3):291-296.

12. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics* 2005;115(5):1367–1377.
13. Rosenbauer J, Herzig P, Giani G. Early infant feeding and risk of type 1 diabetes mellitus a nationwide population-based case-control study in pre-school children. *Diabetes Metab Res Rev.* 2008;24(3):211– 222.
14. Das UN. Breastfeeding prevents type 2 diabetes mellitus: but, how and why? *Am J Clin Nutr.* 2007;85(5):1436–1437.
15. Greer FR, Sicherer SH, Burks AW; American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition, American Academy of Pediatrics Section on Allergy and Immunology. Effects of early nutritional interventions on the development of atopic disease in infants and children: the role of maternal dietary restriction, breastfeeding, timing of introduction of complementary foods, and hydrolyzed formulas. *Pediatrics* 2008; 121(1):183–191.
16. Akobeng AK, Ramanan AV, Buchan I, Heller RF. Effect of breast feeding on risk of coeliac disease: a systematic review and metaanalysis of observational studies. *Arch Dis Child.* 2006;91(1):39–43.
17. Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr.* 2009;155(3):421–426.
18. Bener A, Hoffmann GF, Afify Z, Rasul K, Tewfik I. Does prolonged breastfeeding reduce the risk for childhood leukemia and lymphomas? *Minerva Pediatr.* 2008;60(2):155–161.
19. Kwan ML, Buffler PA, Abrams B, Kiley VA. Breastfeeding and the risk of childhood leukemia: a meta-analysis. *Public Health Rep.* 2004;119(6):521–535.
20. Kramer MS, Aboud F, Mironova E, et al. Breastfeeding and child cognitive development: new evidence from a large randomized trial. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65:578.



21. Quigley MA, Hockley C, Carson C, et al. Breastfeeding is associated with improved child cognitive development: a population-based cohort study. *J Pediatr* 2012; 160:25-32.
22. Hoffman DR, Birch EE, Birch DG, Uauy RD. Effects of supplementation with omega 3 long-chain polyunsaturated fatty acids on retinal and cortical development in premature infants. *Am J Clin Nutr.* 1993 May;57(5 Suppl):807S-812S.
23. Caspi A, Williams B, Kim-Cohen J, et al. Moderation of breastfeeding effects on the IQ by genetic variation in fatty acid metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:18860-5.
24. Carter CS, Altemus M. Integrative functions of lactational hormones in social behavior and stress management. *Ann N Y Acad Sci* 1997;807:164-174.
25. Schwarze CE, Hellhammer DH, Stroehle V, Lieb K, Mobascher A. Lack of breastfeeding: a potential risk factor in the multifactorial genesis of borderline personality disorder and impaired maternal bonding. *J Pers Disord.* 2014 Sep 23:1-17.
26. Sisk PM, Lovelady CA, Dillard RG, Gruber KJ, O'Shea TM. Early human milk feeding is associated with a lower risk of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *J Perinatol.* 2007;27(7): 428–433.
27. Manzoni P, Stolfi I, Pedicino R, Vagnarelli F, Mosca F, Pagni L, Bollani L, Pozzi M, Gomez K, Tzialla C, Borghesi A, Decembrino L, Mostert M, Latino MA, Priolo C, Galletto P, Gallo E, Rizzollo S, Tavella E, Luparia M, Corona G, Barberi I, Tridapalli E, Faldella G, Vetrano G, Memo L, Saia OS, Bordignon L, Messner H, Cattani S, Della Casa E, Laforgia N, Quercia M, Romeo M, Betta PM, Rinaldi M, Magaldi R, Maule M, Stronati M, Farina D; Italian Task Force for the Study and Prevention of Neonatal Fungal Infections, Italian Society of Neonatology Human milk feeding prevents retinopathy of prematurity (ROP) in preterm VLBW neonates. *Early Hum Dev.* 2013 Jun;89 Suppl 1:S64-8.
28. Vohr BR, Poindexter BB, Dusick AM, et al; National Institute of Child Health and Human Development National Research Network. Persistent beneficial effects of breast milk ingested in the neonatal intensive care unit on outcomes of extremely low birth weight infants at 30 months of age. *Pediatrics.* 2007;120(4):e953-9.

29. Oftedal OT. The evolution of milk secretion and its ancient origins. *Animal* 2012; 6(3):355–368.
30. Castellote C, Casillas R, Ramirez-Santana C, Perez-Cano FJ, Castell M, Moretones MG, Lopez- Sabater MC, Franch A. Premature delivery influences the immunological composition of colostrum and transitional and mature human milk. *J Nutr* 2011; 141(6):1181–1187.
31. Pang WW, Hartmann PE. Initiation of human lactation: secretory differentiation and secretory activation. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2007; 12(4):211–221.
32. Kulski JK, Hartmann PE. Changes in human milk composition during the initiation of lactation. *Aust J Exp Biol Med Sci*. 1981; 59(1):101–114.
33. Lonnerdal B. Human milk proteins: key components for the biological activity of human milk. *Adv Exp Med Biol*. 2004; 554:11–25.
34. Jensen, RG. *Handbook of Milk Composition*. Academic Press, Inc.; San Diego, CA: 1995.
35. Valentine CJ, Morrow G, Fernandez S, Gulati P, Bartholomew D, Long D, Welty SE, Morrow AL, Rogers LK. Docosahexaenoic Acid and Amino Acid Contents in Pasteurized Donor Milk are Low for Preterm Infants. *J Pediatr*. 2010; 157(6):906–910.
36. Olivia Ballard JD, Ardythe L.Morrow. Human Milk Composition: Nutrients and Bioactive Factors. *Pediatr Clin North Am*. 2013 February; 60(1): 49–74.
37. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Annu Rev Nutr*. 2005; 25:37–58.
38. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea. *J Nutr*. 2005; 135(5):1304–1307.
39. Gabrielli O, Zampini L, Galeazzi T, Padella L, Santoro L, Peila C, Giuliani F, Bertino E, Fabris C, Coppa GV. Preterm milk oligosaccharides during the first month of lactation. *Pediatrics*. 2011; 128(6):e1520–1531.

40. Dvorak B, Fituch CC, Williams CS, Hurst NM, Schanler RJ. Increased epidermal growth factor levels in human milk of mothers with extremely premature infants. *Pediatr Res.* 2003; 54(1):15– 19.
41. Blum JW, Baumrucker CR. Colostral and milk insulin-like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal (intestinal and systemic) targets. *Domest Anim Endocrinol.* 2002; 23:101–110.
42. Milsom SR, Blum WF, Gunn AJ. Temporal changes in insulin-like growth factors I and II and in insulin-like growth factor binding proteins 1, 2, and 3 in human milk. *Horm Res.* 2008; 69:307– 311.
43. Elmlinger MW, Hochhaus F, Loui A, Frommer KW, Obladen M, Ranke MB. Insulin-like growth factors and binding proteins in early milk from mothers of preterm and term infants. *Horm Res.* 2007; 68:124–131.
44. Corpeleijn WE, Vliet Iv, Dana-Anne H, de Gast-Bakker, Schoor SRDvd, Alles MS, Hoijer M, Tibboel D, van Goudoever JB. Effect of enteral IGF-1 supplementation on feeding tolerance, growth, and gut permeability in enterally fed premature neonates. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46:184–190.
45. Loui A, Eilers E, Strauss E, Pohl-Schickinger A, Obladen M, Koehne P. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and soluble VEGF Receptor 1 (Sflt-1) levels in early and mature human milk from mothers of preterm versus term infants. *J Hum Lact* 2012;28(4):522-8.
46. Newburg DS, Woo JG, Morrow AL. Characteristics and potential functions of human milk adiponectin. *J Pediatr.* 2010; 156:S41–S46.
47. Martin LJ, Woo JG, Geraghty SR, Altaye M, Davidson BS, Banach W, Dolan LM, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Adiponectin is present in human milk and is associated with maternal factors. *Am J Clin Nutr.* 2006; 83:1106–1111.
48. Jarvinen KM, Suomalainen H. Leucocytes in human milk and lymphocyte subsets in cow's milk- allergic infants. *Pediatr Allergy Immunol.* 2002; 13(4):243–254.
49. Patki S, Kadam S, Chandra V, Bhonde R. Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Human Cell.* 2010; 23(2):35–40.

50. Ichikawa M, Sugita M, Takahashi M, Satomi M, Takeshita T, Araki T, Takahashi H. Breast milk macrophages spontaneously produce granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and differentiate into dendritic cells in the presence of exogenous interleukin-4 alone. *Immunology*. 2003; 108(2):189–195.
51. Indumathi S, Dhanasekaran M, Rajkumar JS, Sudarsanam D. Exploring the stem cell and non-stem cell constituents of human breast milk. *Cytotechnology*. 2013;65(3):385-93.
- Riskin A, Almog M, Peri R, Halasz K, Srugo I, Kessel A. Changes in immunomodulatory constituents of human milk in response to active infection in the nursing infant. *Pediatr Res*. 2012; 71(2):220–225.
52. Sabbaj S, Ibegbu CC, Kourtis AP. Cellular immunity in breast milk: implications for postnatal transmission of HIV-1 to the infant. *Adv Exp Med Biol*. 2012; 743:161–169.
53. Yagi Y, Watanabe E, Watari E, Shinya E, Satomi M, Takeshita T, Takahashi H. Inhibition of DC- SIGN-mediated transmission of human immunodeficiency virus type 1 by Toll-like receptor 3 signalling in breast milk macrophages. *Immunology*. 2010; 130(4):597–607.
54. Agarwal S, Karmaus W, Davis S, Gangur V. Immune markers in breast milk and fetal and maternal body fluids: a systematic review of perinatal concentrations. *J Hum Lact*. 2011; 27(2): 171–186.
55. Groer MW, Beckstead JW. Multidimensional scaling of multiplex data: human milk cytokines. *Biol Res Nurs*. 2011; 13(3):289–296.
56. Kverka M, Burianova J, Lodinova-Zadnikova R, Kocourkova I, Cinova J, Tuckova L, Tlaskalova-Hogenova H. Cytokine profiling in human colostrum and milk by protein array. *Clin Chem*. 2007; 53(5):955–962.
57. Zhou Q, Li M, Wang X, Li Q, Wang T, Zhu Q, Zhou X, Wang X, Gao X, Li X. Immune-related MicroRNAs are Abundant in Breast Milk Exosomes. *Int J Biol Sci* 2012; 8(1):118-123.
58. Maltepe E, Saugstad OD. Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis clinical implications. *Pediatr Res* 2009 Mar;65(3):261-8.

59. Tijerina-Saenz 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): 1793-8.
60. Darlow BA, Austin NC. Selenium supplementation to prevent short-term morbidity in preterm neonates. *Cochrane Database Review* 2003; (4): CD003312.
61. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for pasteurization. *Acta Paediatr* 2008; 97(8): 1070-4.
62. Tsopmo A, Diehl-Jones BW, Aluko RE, Kitts DD, Elisia I, Friel JK. Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties. *Pediatr Res* 2009; 66(6): 614-8.
63. Raghuvver TS, McGuire EM, Martin SM, Wagner BA, Rebouché CJ, Buettner GR et al. Lacto-ferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatr Res* 2002;52(6): 964-72.
64. Shoji H, Oguchi S, Fujinaga S, Shinohara K, Kaneko K, Shimizu T et al. Effects of human milk and spermine on hydrogen peroxide induced oxidative damage in IEC-6 cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41(4): 460-5.
65. Yao L, Friel JK, Suh M, Diehl-Jones WL. Antioxidant properties of breast milk in a novel invitro digestion/enterocyte model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 50(6): 670-6.
66. Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 month of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31(3): 270-4.
67. Ezaki S, Ito T, Suzuki K, Tamura M. Association between total antioxidant capacity in breast milk and postnatal age in days in premature infants. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42(2): 133-7.
68. Buescher ES, McIlheran SM. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res* 1988; 24(1): 14-9.
69. Almansa I, Miranda M, Jareño E, Silvestre D. Lipid peroxidation in infant formulas: Longitudinal study at different storage temperatures. *Int Dairy J* 2013;83:83-87.

70. Turolí D, Testolin G, Zanini R, Bellú R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr* 2004; 93(12): 1569-74.
71. Peterson J, Hamosh M, Scallan C, Ceriani R, Henderson T, Mehta N, Armand M, Hamosh P. Milk fat globule glycoproteins in human milk and in gastric aspirates of mother's milk-fed preterm infants. *Pediatr Res*. 1998; 44(4):499–506.
72. Newburg D, Peterson J, Ruiz-Palacios G, Matson D, Morrow A, Shults J, Guerrero M, Chaturvedi P, Newburg S, Scallan C, MRTaylor, Ceriani R, Pickering L. Role of human-milk lactadherin in protection against symptomatic rotavirus infection. *Lancet*. 1998; 351(9110):1160–1164.
73. Naarding MA, Dirac AM, Ludwig IS, Speijer D, Lindquist S, Vestman E-L, Stax MJ, Geijtenbeek TBH, Pollakis G, Hernell O, Paxton WA. Bile Salt-Stimulated Lipase from human milk binds DC-SIGN and inhibits Human Immunodeficiency Virus type 1 transfer to CD4+ T cells. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2006; 50(10):3367–3374.
74. Ruvoen-Clouet N, Mas E, Mariounneau S, Guillon P, Lombardo D, Pendu JL. Bile-salt-stimulated lipase and mucins from milk of 'secretor' mothers inhibit the binding of Norwalk virus capsids to their carbohydrate ligands. *Biochem J*. 2006; 393:627–634.
75. Hettinga K, Valenberg Hv, Vries Sd, Boeren S, Hooijdonk Tv, Arendonk Jv, Vervoort J. The host defense proteome of human and bovine milk. *PloS ONE*. 2011; 6(4):e19433.
76. Yolken RH, Peterson JA, Vonderfecht SL, Fouts ET, Midthun K, Newburg DS. Human milk mucin inhibits rotavirus replication and prevents experimental gastroenteritis. *J. Clin. Invest*. 1992; 90:1984–1987.
77. Bode L, Kuhn L, Kim HY, Hsiao L, Nissan C, Sinkala M, Kankasa C, Mwiya M, Thea DM, Aldrovandi GM. Human milk oligosaccharide concentration and risk of postnatal transmission of HIV through breastfeeding. *Am J Clin Nutr* 2012; 96(4):831–839.
78. Silvestre D, López MC, March L, Plaza A, Martínez-Costa C. Bactericidal activity of human milk: stability during storage. *Br J Biomed Sci*. 2006;63(2):59-62.
79. ESPGHAN Committee on Nutrition. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57(4):535-42.

80. Quigley M, McGuire W. Formula versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 22;4:CD002971.
81. Arslanoglu S, Moro GE, Bellù R, Turolì D, De Nisi G, Tonetto P, Bertino E. Presence of human milk bank is associated with elevated rate of exclusive breastfeeding in VLBWL infants. *J Perinat Med* 2013;41(2):129-31.
82. Lawrence RM, Lawrence RA. Breast milk and infection. *Clin Perinatol.* 2004;31(3):501-28.
83. Pietrasanta C, Ghirardi B, Manca MF, Uccella S, Gualdi C, Tota E, Pugni L, Mosca F. Herpesviruses and breast milk. *Pediatr Med Chir.* 2014;36(3):5.
84. Viljoen J, Tuailon E, Nagot N, Danaviah S, Peries M, Padayachee P, Foulongne V, Bland R, Rollins N, Newell ML, van de Perre P. Cytomegalovirus, and possibly Epstein-Barr virus, shedding in breast milk is associated with HIV-1 transmission by breastfeeding. *AIDS* 2015;29(2):145-53.
85. National Institute for Health and Clinical Excellence (2010) Donor breast milk banks: the operation of donor breast milk bank services. London: National Institute for Health and Clinical Excellence. Available from: [www.nice.org.uk/guidance/CG93](http://www.nice.org.uk/guidance/CG93).
86. Arslanoglu S, Bertino E, Tonetto P, De Nisi G, Ambruzzi AM, Biasini A, Profeti C, Spreghini MR, Moro GE. Italian Association of Human Milk Banks Associazione Italiana Banche del Latte Umano Donato (AIBLUD: [www.aiblud.org](http://www.aiblud.org)). Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010;23 Suppl 2:1-20.
87. Hartmann BT1, Pang WW, Keil AD, Hartmann PE, Simmer K; Australian Neonatal Clinical Care Unit. Best practice guidelines for the operation of a donor human milk bank in an Australian NICU. *Early Hum Dev.* 2007;83(10):667-73.
88. Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, Giuffrida MG, Dellavalle G, Conti A, Tonetto P, Biasini A, Coscia A, Fabris C, Moro GE, Cavallarin L, Bertino E. Effect of two pasteurization methods on the protein content of human milk. *Front Biosci* 2011;1(3): 818-29.

## BIBLIOGRAFÍA

---

89. Terpstra FG, Rechtman DJ, Lee ML, Hoeij KV, Berg H, Van Engelenberg FA, Van't Wout AB. Antimicrobial and antiviral effect of high-temperature short-time (HTST) pasteurization applied to human milk. *Breastfeed Med* 2007 Mar;2(1):27-33.
90. Espinosa-Martos I, Montilla A, de Segura AG, Escuder D, Bustos G, Pallás C, Rodríguez JM, Corzo N, Fernández L. Bacteriological, biochemical, and immunological modifications in human colostrum after Holder pasteurisation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(5):560-8
91. Bertino E, Giribaldi M, Baro C et al. Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56:390-6.
92. Maschmann J, Hamprecht K, Weissbrich B et al. Freeze-thawing of breast milk does not prevent cytomegalovirus transmission to a preterm infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2006;91:F288-93.
93. García-Lara NR, Escuder-Vieco D, García-Algar O, De la Cruz J, Lora D, Pallás-Alonso C. Effect of freezing time on macronutrients and energy content of breastmilk. *Breastfeed Med*. 2012 Aug;7:295-301.
94. Silvestre D, Ferrer E, Gayá J, Jareño E. Available lysine content in human milk: stability during manipulation prior to ingestion. *Biofactors* 2006;26(1):71-9.
95. Pardou A, Serruys E, Mascart-Lemone F et al. Human milk banking: influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. *Biol Neonate*. 1994;65:302-9
96. Akinbi H1, Meizen-Derr J, Auer C, Ma Y, Pullum D, Kusano R, Reszka KJ, Zimmerly K. Alterations in the host defense properties of human milk following prolonged storage or pasteurization. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51(3):347-52.
97. Silvestre D, López MC, March L, Plaza A, Martínez-Costa C. Bactericidal activity of human milk: stability during storage. *Br J Biomed Sci*. 2006;63(2):59-62.
98. Miranda M, Gormaz M, Romero FJ et al. Stability of the antioxidant capacity and pH of human milk refrigerated for 72 hours: longitudinal study. *Nutr Hosp*. 2011; 26:722-8.



99. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Frozen breast milk at -20 degrees C and -80 degrees C: a longitudinal study of glutathione peroxidase activity and malondialdehyde concentration. *J Hum Lact.* 2010 Feb;26(1):35-41.
100. Ewaschuk JB, Unger S, O'Connor DL, Stone D, Harvey S, Clandinin MT, Field CJ. Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. *J Perinatol.* 2011; 31(9):593–598.
101. Peroni D, Piacentini G, Boding A, Pigozzi R, Boner A. Transforming growth factor-beta is elevated in unpasteurized cow's milk. *Pediatr. Allergy Immune.* 2009; 20:42–44.
102. Silvestre D, Ruiz P, Martínez-Costa C et al. Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *J Hum Lact.* 2008;24:371-6.
103. Van Gysel M, Cossey V, Fieuws S, Schuermansvan A. Impact of pasteurization on the antibacterial properties of human milk. *Eur J Pediatr* (2012) 171:1231–1237.
104. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jereño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr* 2008; 97: 1070-174.
105. Ratti C. 2001. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. *J Food Eng* 49:311–319.
106. Shofian NM, Hamid AA, Osman A, Saari N, Anwar F, Dek MSP, Hairuddin MR. 2011. Effect of freeze-drying on the antioxidant compounds and antioxidant activity of selected tropical fruits. *Int J Mol Sci* 12:4678–4692.
107. Vega-Mercado H, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GV. 2001. Advances in dehydration of foods. *J Food Eng* 49:271–289.
108. Lozano G, Castellote A I, Montes R, López SAbacer MC. Vitamins, fatty acids, and antioxidant stability storage of freeze-dried human milk. *Int J Food Sci Nutr*, 2014; 65(6): 703–707.
109. Wojcik KY, Rechtman D J, Martin LL, Montoya A, Medo E T. Macronutrient Analysis of a Nationwide Sample of Donor Breast Milk. *J Am Diet Assoc* 2009;109(1):137-140.

## BIBLIOGRAFÍA

---

110. Stoll BJ, Hansen NI, Bell EF, Shankaran S, Laptook AR, Walsh MC, et al. Neonatal outcomes of extremely preterm infants from the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics*. 2010;126:443-56.
111. Lucas A. Long-term programming effects of early nutrition implications for the preterm infant. *J Perinatol* 2005; 25:S2–S6.
112. Richard A Ehrenkranz, Abhik Das, Lisa A. Wrage, Brenda B. Poindexter, Rosemary D. Higgins, Barbara J. Stoll, William Oh. Early nutrition mediates the influence of severity of illness on extremely low birth weight infants. *Pediatr Res*. 2011; 69(6): 522–529.
113. Isaacs E, Fischl B, Quinn B, Chong W, GAdian D, Lucas A. Impact of breast milk on IQ, brain size and white matter development. *Pediatr Res*. 2010; 67(4): 357–362.
114. Belfort B, Rifas-Shirman S, Sullivan T, Collins T, mcPhee A J, Ryan P, Kleinman DP, Gillman MW, Gibson R A, Makrides M. Infant growth before and after term: effects on neurodevelopment in preterm infants. *Pediatrics*. 2011;128(4): e899–e906.
115. Thureen PJ. Early aggressive nutrition in very preterm infants. *Nestle Nutr Workshop Ser Pediatr Program*. 2007;59:193-204.
116. Lafeber HN, Van de Lagemat M, Rotteveel J, Van Weissenbruch M. Timing of nutritional interventions in very-low-birth-weight infants: optimal neurodevelopment compared with the onset of the metabolic syndrome. *Am J Clin Nutr* 2013;98(2):556S-60S.
117. Agostoni, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, Domellöf M, Embleton ND, Fusch C, Genzel-Boroviczeny O, Goulet O, Kalhan SC, Kolacek S, Koletzko B, Lapillonne A, Mihatsch W, Moreno L, Neu J, Poindexter B, Puntis J, Putet G, Rigo J, Riskin A, Salle B, Sauer P, Shamir R, Szajewska H, Thureen P, Turck D, van Goudoever JB, Ziegler EE; ESPGHAN Committee on Nutrition Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(1):85-91.
118. Koletzko B, Goulet O, Hunt J, Krohn K, Shamir R for the Parenteral Nutrition Guidelines Working Group. Guidelines on Paediatric Parenteral Nutrition of the Euro-

pean Society of Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) and the European Society for Clinical Nutrition and Metabolism (ESPEN), Supported by the European Society of Paediatric Research (ESPR). *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005;(41):S1–S4.

119. Ehrenkranz RA. Early aggressive nutritional management for very low birth weight infants: what is the evidence? *Semin Perinatol*. 2007;31:48-55.

120. Dinerstein A, Nieto RM, Solana CL, Perez GP, Otheguy LE, Larguia AM. Early and aggressive nutritional strategy (parenteral and enteral) decreases postnatal growth failure in very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2006;26:436-42.

121. McCallie KR, Lee HC, Mayer O, Cohen RS, Hintz SR, Rhine WD. Improved outcomes with a standardized feeding protocol for very low birth weight infants. *J Perinatol*. 2011;31:S61-7.

122. Patole SK, de Klerk N. Impact of standardised feeding regimens on incidence of neonatal necrotising enterocolitis: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2005;90:F147-51.

123. Kuschel CA, Harding JE. Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;1: CD000343.

124. Arslanoglu S, Moro G, Ziegler EE. Adjustable fortification of human milk fed to preterm infants: does it make a difference? *J Perinatol* 2006;26(10):614–621.

125. Rochow N, Fusch G, Zapanta B, Ali A, Barui S, Fusch C. Target fortification of breast milk: how often should milk analysis be done?. *Nutrients* 2015;7: 2297-2310.

126. de Halleux V, Rigo J. Variability in human milk composition: benefit of individualized fortification in very-low birth weight infants. *Am J Clin Nutr*. 2013; 98(2):529S-35S.

127. de Halleux V, Stalport S, Studzinski F, Habibi F, Rigo J. Advantages of individualized fortification of human milk for preterm infants. *Arch Pediatr*. 2007;14 Suppl 1:S5-10.

128. Biasini A, Neri C, China MC, Monti F, Di Nicola P, Bertino E. Higher protein intake strategies in human milk fortification for preterms infants feeding. Auxological and neurodevelopmental outcome. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26(3 Suppl):43-7.

129. Rochow N, Landau-Crangle E, Fusch C. Challenges in breast milk fortification for preterm infants. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2015;18(3):276-84.
130. Kreissl A, Zwiauer V, Repa A, et al. Effect of fortifiers and additional protein on the osmolarity of human milk: is it still safe for the premature infant? *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57: 432–437.
131. Fanaroff AA, Stoll BJ, Wright LL, Carlo WA, Ehrenkranz RA, Stark AR, Bauer CR, Donovan EF, Korones SB, Laptook AR, Lemons JA, Oh W, Papile LA, Shankaran S, Stevenson DK, Tyson JE, Poole WK; NICHD Neonatal Research Network. Trends in neonatal morbidity and mortality for very low birthweight infants. *Am J Obstet Gynecol*. 2007;196(2):147.e1-8.
132. Saugstad OD. Bronchopulmonary dysplasia-oxidative stress and antioxidants. *Semin Neonatol*. 2003; 8(1):39-49.
133. Perrone S, Tataranno ML, Santacroce A, Negro S, Buonocore G. The role of oxidative stress on necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Curr Pediatr Rev*. 2014;10(3):202-207.
134. Hartnett ME. Pathophysiology and mechanisms of severe retinopathy of prematurity. *Ophthalmology*. 2015 Jan;122(1):200-210.
135. Saugstad, O. Update on oxygen radical disease in neonatology. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology* 2001;13(2);147-153.
136. Shoji H, Oguchi S, Shimizu T, Yamashiro Y. Effecto of human brast milk on urinary 8-hydroxy-2'deoxyguanosine excretion in infants. *Pediatr Res* 2003;53(5):850-852.
137. Shoji H, Shimizu T, Shinohara K, oguchi S, Shiga S, yamashiro Y. Suppressive efectos of breast milk on oxidative damage in very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004;89(2):F136-8.
138. Ledo A, ArduiniA, Asensi MA, Sastre j, Escrig R, Brugada M et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2009;89(1):210-5.

139. Friel JK, Diehl-Jones B, Cockell KA, Chiu A, Rabanni R, Davies SS, Roberts LJ2nd. Evidence of oxidative stress in relation to feeding type during early life in premature infants. *Pediatr Res* 2011;69(2):160-4.
140. Nikniaz L, Mahdavi R, Ostadrahimi A, Hejazi MA, Vatankhah AM. Effects of synbiotic supplementation on total antioxidant capacity of human breastmilk. *Breastfeed Med*. 2013;8:217-22.
141. Codoñer-Franch P, Hernández-Aguilar MT, Navarro-Ruiz A, López-Jaén AB, Borja-Herrero C, Valls-Bellés V. Diet supplementation during early lactation with non-alcoholic beer increases the antioxidant properties of breastmilk and decreases the oxidative damage in breastfeeding mothers. *Breastfeed Med*. 2013;8:164-9.
142. Delgado-Noguera MF, Calvache JA, Bonfill Cosp X. Supplementation with long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFA) to breastfeeding mothers for improving child growth and development. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 Dec 8;(12):CD007901.
143. Casper C, Carnielli VP, Hascoet JM, Lapillonne A, Maggio L, Timdahl K, Olsson B, Vågerö M, Hernell O. rhBSSL improves growth and LCPUFA absorption in preterm infants fed formula or pasteurized breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2014; 59(1):61-9.
144. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Evid Based Child Health*. 2014;9(3):584-671.
145. Pammi M, Abrams SA. Oral lactoferrin for the prevention of sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb 20;2:CD007137.
146. Howlett A, Ohlsson A, Palatal N. Inositol in preterm infants at risk for or having respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Feb 4;2:CD000366.
147. Spatz DL, Schmidt KJ, Kinzler S. Implementation of a human milk management center. *Adv Neonatal Care*. 2014 ;14(4):253-61.
148. Kleyn D.H., Lynch J.M., Barbano D.M., Bloom M.J. & Mitchel M.W. (2001) Determination of fat in raw and processed milks by the Gerber method: collaborative study. *J AOAC Int* 2001; 84(5):1499–1508.

## BIBLIOGRAFÍA

---

149. Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
150. Hinton C.L. & Macara T. The determination of aldose sugars by means of chloramine-T, with special reference to the analysis of milk products. *Analyst* 1927;52:668–688.
151. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986;1(8476):307-10.
152. Krouwer JS. Why Bland-Altman plots should use X, not  $(Y+X)/2$  when X is a reference method. *Stat Med* 2008;27(5):778-780.
153. Lynch JM, Barbano DM. Kjeldahl nitrogen analysis as a reference method for protein determination in dairy products. *J AOAC Int.* 1999;82(6):1389-98.
154. Menjo A, Mizuno K, Murase M.Y, Nishida Y, Taki M, Itabashi K. et al. (2009) Bedside analysis of human milk for adjustable nutrition strategy. *Acta Paediatrica* 98, 380–384.
155. Casadio Y.S., Williams T.M., Lai C.T., Olsson S.E., Hepworth A.R. & Hartman P.E. (2010) Evaluation of a mid-infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk. *J Hum Lact* 2010;26(4): 376–383.
156. Smilowitz JT1, Ghosh DS, Mirmiran M, German JB, Underwood MA Rapid measurement of human milk macronutrients in the neonatal intensive care unit: accuracy and precision of fourier transform mid-infrared spectroscopy. *J Hum Lact.* 2014 May;30(2):180-9.
157. Fusch G, et al., Rapid measurement of macronutrients in breast milk: How reliable are infrared milk analyzers?. *Clin Nutr* 2015;34(3):465-76.
158. Cooper AR, Barnett D, Gentles E, Cairns L, Simpson JH. Macronutrient content of donor human breast milk. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013;98(6):F539-41159.
159. Bauer J. & Gerss J. Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clin Nutr* 2011;30: 215– 220.

160. Moltó-Puigmartí C., Castellote A.I., Carbonell-Estrany X. & López-Sabater M.C. (2011) Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clin Nutr* 2011;30:116–123.
161. Gidrewicz , Fenton. A systematic review and meta-analysis of the nutrient content of preterm and term breast milk. *BMC Pediatrics* 2014, 14:216 <http://www.biomedcentral.com/1471-2431/14/216>.
162. Kunz C., Rudloff S., Baier W., Klein N. & Strobel S. (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr* 2000;20: 699–722.
163. Billard H, Simon L, Desnots E, Sochard A, Boscher C, Riaublanc A, Alexandre-Gouabau MC, Boquien CY. Calibration Adjustment of the Mid-infrared Analyzer for an Accurate Determination of the Macronutrient Composition of Human Milk. *J Hum Lact.* 2015 Jun 2. pii: 0890334415588513.
164. Ankrah N, Appiah-Opong R and Dzokoto C. Human breast milk storage and the glutathione content. *J Trop Pediatr* 2000; 46: 111-113.
165. Silvestre D, Lagarda MJ, Far R et al. A study of factors that may influence the determination of copper, iron, and zinc in human milk during sampling and in simple individuals. *Biol Trace Elem Res* 2000; 76: 217-227.
166. Ermis B, Yildirim A, Ors R, Tastekin A, Ozkan B, Akcay F. Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and antioxidant potential levels in mothers at the postpartum seventh day. *Biol Trace Elem Res* 2005; 105: 27-36.
167. Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Bosch-Morell F, Romero FJ, Silvestre D. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors.* 2004;20(3):129-37.
168. L'Abbe MR, Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31(3):270-4.

## BIBLIOGRAFÍA

---

169. Turolí D, Testolin G, Zanini R, Bellu R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr* 2004; 93: 1569-1574.
170. Buss IH, McGil F, Darlow BA, Winterbourn CC. Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr* 2001; 90: 813-815.
171. Aksu T, Atalay Y, Türkyılmaz C, Gülbahar O, Hirfanoğlu IM, Demirel N, Onal E, Ergenekon E, Koç E. The effects of breast milk storage and freezing procedure on interleukine-10 levels and total antioxidant activity. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2014 13:1-4.
172. Akdag A1, Sari FN, Dizdar EA, Uras N, Isikoglu S, Erel O, Dilmen U. Storage at -80°C preserves the antioxidant capacity of preterm human milk. *J Clin Lab Anal.* 2014 Sep;28(5):415-8.
173. <http://www.rede.BLH.fiocruz.br> Consultado 01/07/2015
174. Ogundele MO. Effects of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 205-211.
175. Hedge AM, Vikyath R. Cariogenic potential of stored human milk—an in-vitro study. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 32: 27-32.
176. Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, Henderson TR, Hamosh P. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics* 1996; 97: 492-498.
177. Henderson TR, Fay TN, Hamosh M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr* 1998; 132: 876-878.
178. Lepri L, Del Bubba M, Maginni R, Donzelli GP, Galvan P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J. Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 19: 1-10.
179. Collado MC, Delgado S, Maldonado A, Rodríguez JM. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.* 2009;48:523-8.
180. Jeurink PV, Van Berghenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L,



---

Garsen J, Knol J, Rodríguez JM, Martín R. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microb* 2013;1:17-30.

181. Martínez-Costa C, Silvestre MD, López MC, Plaza A, Miranda M, Guijarro R Effects of refrigeration on the bactericidal activity of human milk: a preliminary study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45:275-7.

182. Hernandez J, Lemons P, Lemons J, Todd J. Effect of storage processes on the bacterial growth inhibiting activity of human breast milk. *Pediatrics* 1979;63:597-601.

183. Takci S, Gulmez D, Yigit S, Dogan O, Dik K, Hascelik G. Effects of freezing on the bactericidal activity of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:146-9.

184. Lawrence RA. Milk banking: the influence of storage procedures and subsequent processing on immunologic components of human milk. *Adv Nutr Res* 2001;10: 389-404.

185. Ellis L, Picciano MF, Smith AM, Hamosh M, Mehta NR. The impact of gestational length on human milk selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *Pediatr Res* 1990;27:32.

186. Ronayne De Ferrer PA, Baroni A, Sambucetti ME, López NE, Ceriani Cernadas JM. Lactoferrin levels in term and preterm milk. *J Am Coll Nutr* 2000;19:370-3.

187. Ballabio C, Bertino E, Coscia A, Fabris C, Fuggetta D, Molfino S, Testa T, Sgarrella MC, Sabatino G, Restani P Immunoglobulin-A profile in breast milk from mothers delivering full term and preterm infants. *Int J Immunopath Pharmacol* 2007;20:119-28.

188. Zachariassen G , Fenger-Gron J, Hviid MV, Halken S. The content of macronutrients in milk from mothers of very preterm infants is highly variable. *Dan Med J* 2013;60(6):A4631.

189. Zheng MC, Zhang GF, Zhou LS, Guo XG, Quan YF. Alpha-tocopherol concentrations in human milk from mothers of preterm and full-term infants in China. *Biomed Environ Sci* 1993;6:259-64.

## BIBLIOGRAFÍA

---

190. Wang M, Li M, Wu S, Lebrilla CB, Chapkin RS, Ivanov I, Donovan SM. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2015 Jun;60(6):825-33.
191. Donovan SM, Wang M, Li M, Friedberg I, Schwartz SL, Chapkin RS. Host-microbe interactions in the neonatal intestine: role of human milk oligosaccharides. *Adv Nutr.* 2012;3(3):450S-5S.
192. Ryan JM, Rice, GE, Mitchell MD. The role of gangliosides in brain development and the potential benefits of perinatal supplementation. *Nutr Res* 2013;33:877-87.
193. Rueda R. The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *Br J Nutr* 2007;98:S68-73.
194. Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: Implications for biology and disease. *Lab Inv* 2007;87:851-7.
195. Newburg DS, Ruiz-Palacios G M, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Ann Rev Nutr* 2005;25:37-58.
196. Carlson SE. N-acetylneuraminic acid concentrations in human-milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am J Clin Nutr* 1985;41:720-6.
197. Martín-Sosa S, Martín MJ, García-Pardo R, Hueso P. Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:499- 503.
198. Neeser JR, Golliard M, Del Vedovo S. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. *J Dairy Sci* 1991;74:2860-71.
199. Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, et al. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2001;74:510-515.
200. Sprong RC, Hulstein MFE, Van der Meer R. Bovine milk fat components inhibit foodborne pathogens. *Int Dairy J* 2002;12;3:209-15.



# ANEXOS



## Original Article

# Comparison of mid-infrared transmission spectroscopy with biochemical methods for the determination of macronutrients in human milk

Dolores Silvestre\*, Miriam Fraga\*, María Gormaz<sup>†‡</sup>, Ester Torres<sup>†</sup> and Máximo Vento<sup>†‡</sup>

\*Department of Pharmacy, University CEU Cardenal Herrera, Moncada, Valencia, Spain, <sup>†</sup>Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain, and <sup>‡</sup>Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain

## Abstract

The variability of human milk (HM) composition renders analysis of its components essential for optimal nutrition of preterm fed either with donor's or own mother's milk. To fulfil this requirement, various analytical instruments have been subjected to scientific and clinical evaluation. The objective of this study was to evaluate the suitability of a rapid method for the analysis of macronutrients in HM as compared with the analytical methods applied by cow's milk industry. Mature milk from 39 donors was analysed using an infrared human milk analyser (HMA) and compared with biochemical reference laboratory methods. The statistical analysis was based on the use of paired data tests. The use of an infrared HMA for the analysis of lipids, proteins and lactose in HM proved satisfactory as regards the rapidity, simplicity and the required sample volume. The instrument afforded good linearity and precision in application to all three nutrients. However, accuracy was not acceptable when compared with the reference methods, with overestimation of the lipid content and underestimation of the amount of proteins and lactose contents. The use of mid-infrared HMA might become the standard for rapid analysis of HM once standardisation and rigorous and systematic calibration is provided.

**Keywords:** human milk, macronutrients, milk banking, quantitative methods, milk analysers, fortification.

Correspondence: Máximo Vento, Division of Neonatology & Neonatal Research Unit, University and Polytechnic Hospital La Fe & Health Research Institute La Fe, Bulevar Sur s/n, 46026 Valencia, Spain. E-mail: maximo.vento@uv.es

## Introduction

The numerous benefits derived from the use of human milk (HM) as sole nutrient during the first months of life have been explicitly underscored by international health organisations and justify generalisation of its use in all newborn infants, particularly in the most vulnerable such as preterm and/or low-birthweight infants [Henderson *et al.* 2007; World Health Organization (WHO) 2011; American Academy of Pediatrics 2012]. As a consequence, there has been a growing interest in developing human milk banks (HMBs) worldwide, with the objective of pro-

viding neonates whose mothers are not able to breast-feed with HM coming from donor mothers. In addition, the introduction of HMBs offers economic benefits as it reduces the incidence and/or severity of numerous diseases, particularly necrotizing enterocolitis (Arnold 2002; Italian Association of Human Milk Bank 2010; European Milk Bank Association 2012).

Routinely, donor milk is collected, subjected to chemical and microbiological control and pasteurisation, and stored until consumption. HMB is always consumed under medical prescription (Italian Association of Human Milk Bank 2010). HM composition

is widely variable and may not always satisfy individual nutritional needs (Silvestre *et al.* 2001; Bokor *et al.* 2007; Bauer & Gerss 2011; Moltó-Puigmartí *et al.* 2011). Preterm infants are at high risk of undernutrition. HM fortifiers added to HM in these patients enhance protein, energy and mineral provision, and improve growth and nitrogen retention (Arslanoglu *et al.* 2010). However, standard fortification is made assuming a fixed composition of HM. Information regarding the precise composition of HM would be of relevance to optimise fortification either with own mother's milk or with bank donor's milk (Arslanoglu *et al.* 2010).

In this scenario, generalisation of HMBs has led to an increasing demand for suitable methods capable of rapidly and reliably analysing large number of HM samples using only small aliquots. Conventional analytical methods used for quality control or research purposes do not meet these criteria because they are tedious, time-consuming and require large milk volumes. In recent years, new spectrophotometric instruments similar to the ones used in the dairy industry for the analysis of cow's milk but technically adapted to the requirements of HMBs have been developed. Among the different options, infrared (IR) spectrophotometry has been shown to be very useful for the analysis of macronutrients in HM (Michaelsen *et al.* 1988; Sauer & Kim 2001; Corvaglia *et al.* 2008; Menjo *et al.* 2009; Casadio *et al.* 2010). The convenient handling characteristics of this technique offer an attractive alternative to classical analytical procedures. To add new information, we have launched a prospective study to compare the precision and suitability of the mid-infrared (MIR) HMA (Miris AB<sup>®</sup>, Uppsala, Sweden) for routine quantification of fat, protein and lactose in HM with the biochemical methods routinely employed for the analysis

of cow's milk as recommended by the International Dairy Federation ([http://www.cd3wd.com/cd3wd\\_40/LSTOCK/004/X6537E/X6537E05.htm](http://www.cd3wd.com/cd3wd_40/LSTOCK/004/X6537E/X6537E05.htm)).

## Material and methods

### Milk donors and sample collection

Analysis of mature milk from 39 donors (HMB; Division of Neonatology, University & Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain) was performed in the Department of Pharmacy (University CEU Cardenal Herrera, Valencia, Spain). Milk donors delivered at term (range: 37–41 weeks; median: 39 weeks). Milk was expressed from both breasts using an electric pump (Lactina; Medela, Baar, Switzerland) into a sterile container until emptying was completed (*c.* 10–15 min in each breast). Extracted milk was poured into a labelled sterile container and kept frozen at –20°C until processed. For processing, the milk sample was allowed to thaw at room temperature. Before samples were analysed by HMA, they were warmed up to 40°C and homogenised (1.5 s per 1 mL of sample) with an ultrasonic vibrator (VCX 130; Sonics & Material, Newtown, CT, USA). Biochemical analysis did not require previous warming of the samples and were homogenised as described. Thereafter, a total of 44 mL was homogenised by manual agitation and further used for analytical purposes. Out of these, an aliquot of 2 mL was pipetted into a sterile recipient for HMA analysis, while the rest was fractioned into three aliquots: 20 mL for lipids, 2 mL for protein and 20 mL for lactose determination, respectively.

The study was approved by the Ethics and Scientific Committee of the Hospital Universitario y Politécnico La Fe and does not comprise ethical issues

### Key messages

- Individualised fortification of HM favours the achievement of nutritional needs especially in preterm infants.
- Traditional methods of analysis require large volumes of sample and are very tedious and time-consuming.
- On the contrary, MIR transmission spectroscopy HMAs only need a small volume of milk to perform analysis and are extremely rapid and accurate.
- However, HMA needs to be periodically calibrated to avoid misreading that could endanger the quality of supplementation.

as only mothers who were producing exceeding amounts of milk for their own baby and willing to donate or already donating milk to the milk bank were approached to participate in the study.

### Direct analysis with the HMA

HMA is based on semi-solid MIR transmission spectroscopy. The chemical groups directly correlated with fat, protein and lactose are measured at different waveband areas through waveband filters. The wavebands are specific for each of the functional groups measured: carbonyl groups (5.7 mm) and carbon-hydrogen groups (3.5 mm) for fat determination; amide groups (6.5 mm) for protein determination; and hydroxyl groups (9.6 mm) for lactose determination (Casadio *et al.* 2010).

The HMA was operated in 'processed milk' mode, indicated for frozen samples. The instrument has two built-in modes – 'processed' and 'unprocessed' for fresh and frozen milk, respectively. The analyser has a different calibration for fresh and frozen milk because milk fat globule size changes with storing, requiring homogenisation prior to its analysis. Manufacturer calibration is based on reference samples that have been homogenised with an ultrasonic vibrator. However, no negative control was used because the manufacturer does not provide with calibration standards and does not inform on how they should be performed.

Samples were allowed to thaw, warmed up to 40°C and homogenised (1.5 s per 1 mL of sample) with an ultrasonic vibrator (VCX 130; Sonics & Material).

### Analysis with reference laboratory methods

The analytical assays employed in our studies follow the standard recommendations of the International Dairy Federation ([http://www.cd3wd.com/cd3wd\\_40/LSTOCK/004/X6537E/X6537E05.htm](http://www.cd3wd.com/cd3wd_40/LSTOCK/004/X6537E/X6537E05.htm)).

#### *Fat determination (Gerber method)*

This is a volumetric determination of the lipid fraction using a specially calibrated butyrometer by centrifugation for 5 min at 2000 r.p.m. after aqueous

fraction component (especially proteins) digestion with sulphuric acid. The sample volume required is 10 mL and the procedure lasts for 30 min (Kleyn *et al.* 2001).

#### *Protein determination (Bradford method)*

This is a colorimetric technique that measures Coomassie blue protein complex absorbance using bovine serum albumin as the standard. A commercially available reagent was employed (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA). The sample volume required is 1 mL and the procedure lasts for 1–2 min (Bradford 1976).

#### *Lactose determination (Chloramine-T method)*

After milk deproteinisation with tungstic acid and posterior filtration, lactose is quantified according to iodine production in lactose IK-Chloramine-T reaction based on the reducing characteristic of lactose using 0.04 M thiosulfate. The sample volume required is 10 mL and the procedure lasts for 120 min (Hinton & Macara 1927).

As an initial step, we assessed precision and linearity of the different laboratory methods employed to analyse HM composition. Precision of a method refers to the degree of reproducibility of the specific method employed, considering that accidental mistakes may influence the results. Calculation is made in 'n' simultaneously obtained aliquots within the same working session (intra-assay precision) and in aliquots obtained from the same sample in different working sessions (inter-assay). Hence, precision between two different tests was calculated by performing an analysis of 16 aliquots of the same sample (8 aliquots per method). Precision was expressed as coefficient of variation (CV %) and was calculated as follows:  $CV \% = 100 \times \text{standard deviation (SD)} / \text{mean value for 'n' determinations}$ . The linearity of the methods for each nutrient was tested using various dilutions of a standard formula (Hero España SA®, Alcantarilla, Spain) due to the lack of certified HM samples. Dilutions employed assured that minimum and maximum concentration values for each of the analysed nutrients were comprised within the range present in HM. The artificial formula was diluted as

follows: 6.2, 5, 3.8, 2.5 and 1.2 g per 100 mL of distilled water for fat; 2.5, 2, 1.5, 1 and 0.5 g per 100 mL of distilled water for proteins; and 8, 7, 6 and 5 g in 100 mL of distilled water for lactose. Each result was expressed as a correlation coefficient ( $r$ ). Likewise, the between-test precision of the HMA was evaluated based on determination in 20 aliquots of the same sample (10 aliquots in each test) and calculation of the mean percentage coefficient of variation between the two tests. The linearity of the HMA technique was evaluated based on dilutions of a sample of HM in proportions of 1:1, 1:2 and 1:3 for the analysis of fat and lactose as the HMA cannot be used in infant formulas or dairy products.

#### Differences between HMA and biochemical methods

Full analysis using biochemical methods requires >25 mL of sample volume, at least 2 h for completing the procedure and trained analyst, whereas HMA analysis of macronutrients can be performed using a substantially smaller sample volume (1 mL), less time (1 min) and minimum training. Moreover, MHA offers also the possibility of point-of-care analysis.

#### Statistical analysis

The Statgraphics plus 5.0 statistical package (Statpoint Technologies Inc., Warrenton, VA, USA) was used for the statistical analysis and MedCalc Software version 12.2.1 (MedCalc Software, Broekstraat 52, 9030 Mariakerke, Belgium) for Bland–Altman test. The differences between the results obtained with the HMA technique and the traditional methods were individually analysed using the Bland–Altman test (Bland & Altman 1986), which allows the comparison of new measurement technique with an established one and verify if it agrees sufficiently as to replace the standard one. Results of the comparison were expressed using Bland–Altman plots, which allow the comparison of two measurements techniques. In this graphical method, the differences between the two techniques are plotted against the averages of the two techniques or, when one of the methods is a reference or ‘gold standard’ method, against that particular

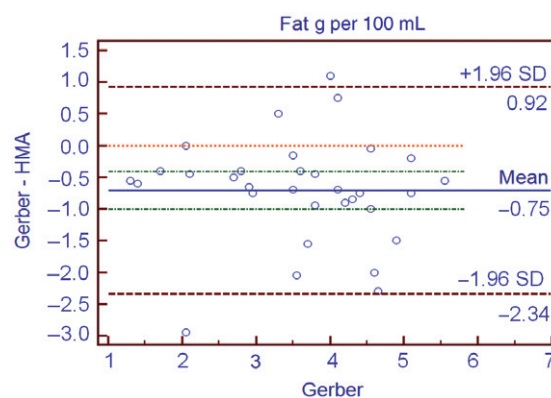
method (Krouwer 2008). Significant differences between methods were evaluated using linear correlation between both methods ( $r^2$ ). Statistical significance was considered for  $P < 0.05$ .

## Results

The Gerber (Kleyn *et al.* 2001), Bradford (Bradford 1976) and Chloramine-T (Hinton & Macara 1927) methods proved to be valid for the determination of total lipids, protein and lactose in HM samples. Validation of the methods yielded the following precision values: 1.29% (Gerber), 6.91% (Bradford) and 2.15% (Chloramine-T). Linearity at the considered concentrations was  $r^2 = 0.9996$  for the Gerber method,  $r^2 = 0.9977$  for the Bradford method and  $r^2 = 0.9928$  for the Chloramine-T, respectively. Accordingly, these methods were considered adequate for use as reference techniques vs. direct analysis with the HMA.

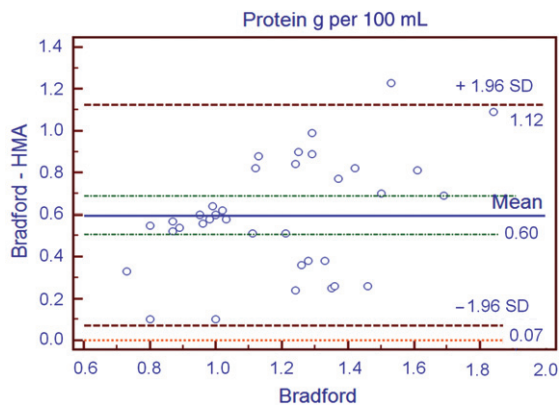
Conversely, evaluation of the HMA technique yielded a between-test precision of 5.19%, 3.08% and 1.40% for fat, proteins and lactose, respectively. The study of linearity at the considered concentrations yielded the following linearity values expressed as correlation coefficients:  $r^2 = 0.9988$  for fat,  $r^2 = 0.9822$  for protein, and  $r^2 = 0.9975$  for lactose, respectively.

Figures 1–3 show the differences between the biochemical methods employed for the determination

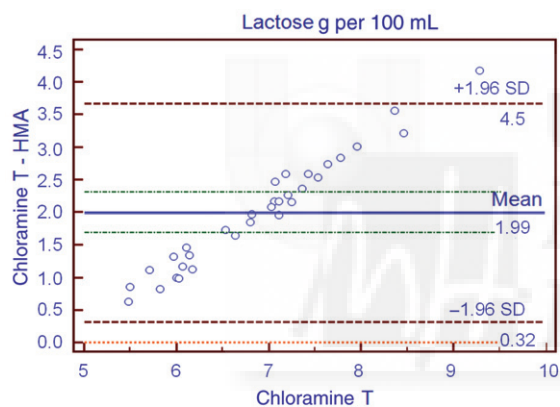


**Fig. 1.** Bland–Altman plot for fat analysis. Difference between the values obtained with laboratory (Gerber; Kleyn *et al.* 2001) and HMA methods is represented in the Y-axis. The results obtained using the Gerber method are represented in the X-axis.





**Fig. 2.** Bland–Altman plot for protein analysis. Difference between the values obtained with laboratory (Bio-Rad; Bradford 1976) and HMA methods is represented in the Y-axis. Bio-Rad method results are represented in the X-axis.



**Fig. 3.** Bland–Altman plot for lactose analysis. Difference between the values obtained with laboratory (Chloramine-T; Hinton & Macara 1927) and HMA methods is represented in the Y-axis. Chloramine-T method results are represented in the X-axis.

of fat (Gerber), protein (Bradford) and lactose (Chloramine-T) and the IR HMA using the Bland–Altman statistical method (Bland & Altman 1986; Krouwer 2008). Hence, Fig. 1 depicts the mean (–0.75) and  $\pm 1.96$  SD (0.92–2.34) differences between the Gerber and HMA methods for fat analysis. All values are included within the confidence interval except for two. Differences do not show any statistically significant tendency. In Fig. 2, mean (0.6) and  $\pm 1.96$  SD (0.07–1.12) differences for protein determination between Bradford and HMA methods for the determination of proteins are shown. Bradford

method shows higher values than HMA; however, all values are within the confidence interval. Differences do not show any statistically significant tendency. Figure 3 represents mean (1.99) and  $\pm 1.96$  SD (0.32–4.5) differences between Chloramine-T and HMA methods for lactose analysis. Lactose values determined by the Chloramine-T method are higher than those obtained using the HMA. All values but one are within the confidence interval. Graphic shows the tendency to enhance differences with greater lactose values.

Table 1 reports the mean value and SD for macronutrients (fat, protein and lactose). As shown in Table 1, application of the Student's *t*-test for paired data showed the differences between direct HMA analysis and analysis with the traditional methodology to be very significant ( $P < 0.01$  and  $P < 0.001$  for fat, proteins and lactose, respectively).

After confirming the existence of differences between the methods, we evaluated the existence of a linear relationship between them.

Figures 4–6 represent the scatter plots for fat, protein, and lactose evaluated by both traditional (represented as 'biochemical') and autoanalyser methods. Regression analysis for fat (Fig. 4) showed a highly significant correlation coefficient  $r^2 = 0.8155$  ( $P < 0.01$ ). In addition, regression analysis for proteins and lactose (Figs 5,6) also showed a significant correlation ( $r^2 = 0.53244$ ;  $P < 0.01$  and  $r^2 = 0.4088$ ;  $P < 0.002$ , respectively).

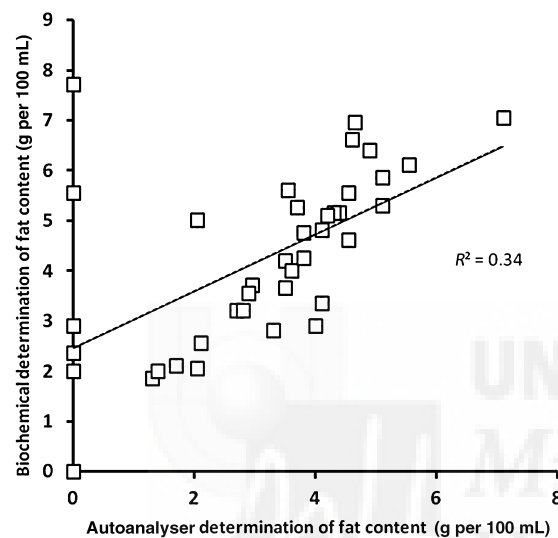
## Discussion

The present study shows the presence of significant differences relative to macronutrient concentrations (fat, protein and lactose) in mature HM between routinely used biochemical assays and the IR HMA (Table 1). Hence, the Gerber method (Kleyn *et al.* 2001) for quantification of milk fat content consistently showed significantly lower concentrations than the HMA method. Both techniques showed the expected inter-individual variations inherent to HM, and the concentrations obtained with both procedures were within the ranges published for lipid concentrations in HM (Lucas *et al.* 1978; Jensen & Clark 1984; Kleyn *et al.* 2001). Although the differences

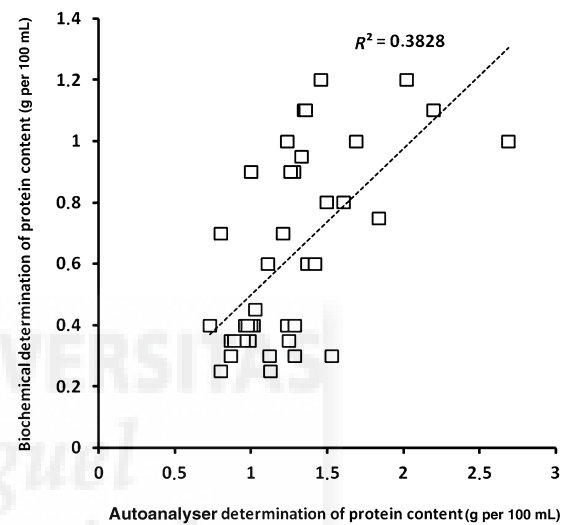
**Table 1.** Comparison of lipid, protein and lactose concentrations in human milk (expressed in g per 100 mL) as determined with the infrared autoanalyser (HMA) and the conventional laboratory methods (LAB) using Student's *t*-test for paired samples

Component (g per 100 mL)	<i>n</i>	HMA	LAB	Significance
Lipids	32	4.29 ± 1.43	3.59 ± 1.13	<0.01
Protein	36	0.59 ± 0.29	1.19 ± 0.27	<0.001
Lactose	32	4.9 ± 0.17	6.89 ± 0.91	<0.001

Laboratory methods employed for the determination of lipids, protein and lactose were the Gerber, Bradford and Chloramine-T techniques, respectively.



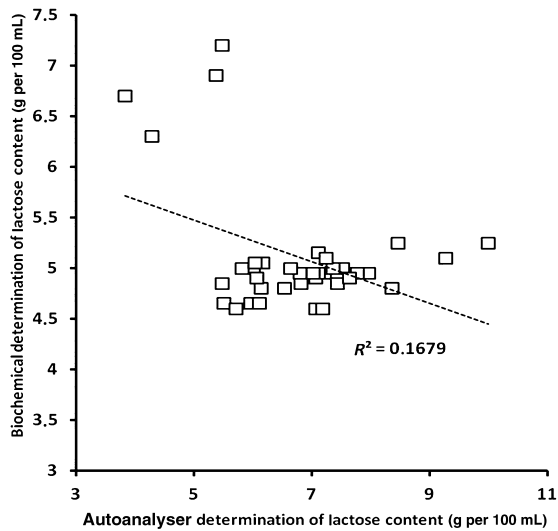
**Fig. 4.** Scatter plot representing results obtained for lipid concentration using both methods (biochemical: Gerber technique and autoanalyser: HMA autoanalyser).



**Fig. 5.** Scatter plot representing results obtained for protein concentration using both methods (biochemical: Bradford technique and autoanalyser: HMA autoanalyser).

obtained were statistically significant, a good correlation was observed among the data, suggesting that the differences between the methods could be obviated by readjusting the calibration of the autoanalyser. Other authors have obtained similar results, comparing the autoanalyser with other biochemical methods (Folch and Röse Gottlieb methods, respectively) (Quigley *et al.* 2007). The protein concentrations obtained with both methods showed important differences on the order of 0.59 g per 100 mL, but with differences as high as 1.23 g per 100 mL in some of the samples. This striking difference is a relevant matter of concern because protein content of HM is a precluding condition to enrich HM. The analysis of these differences showed the Bradford method to yield significantly higher values than the HMA in all the

samples analysed. Moreover, the linear correlation between the two techniques was low. As has been shown in the present study, the concentration of protein in HM is generally more stable than the concentration of lipids. In this sense, the SD was low and similar for both methods despite the fact that the mean concentration reported by the Bradford technique doubled that obtained with HMA. It is important to mention that the concentrations obtained with the HMA were far lower than expected, according to the mean protein concentrations in HM documented in the literature (Atkinson *et al.* 1980), while the Bradford method yielded values within the expected range. Therefore, in the absence of certified samples of HM and considering the analytical parameters obtained with both methods, it seems reasonable to



**Fig. 6.** Scatter plot representing results obtained for lactose concentration using both methods (biochemical: Chloramine-T technique and autoanalyser: HMA autoanalyser).

recommend adjustment and calibration of the HMA before use for quantifying proteins. Other authors have conducted similar studies (Quigley *et al.* 2007), but using a different reference technique (the Kjeldahl method). Their results did not coincide with ours; however, significant differences were recorded with respect to the HMA, the latter technique overestimated the concentration of proteins in HM as opposed to our findings. Similarly as with the other components, lactose concentration in the samples showed significant differences according to whether the HMA or traditional Chloramine-T technique was used. Hence, the HMA yielded a comparatively lesser concentration in all the analysed samples, with values of close to 5 g per 100 mL in all cases. The HMA therefore appears to underestimate the usually reported lactose concentration in HM (Andersson *et al.* 1981). In contrast, the conventional laboratory method yielded values similar to those expected for HM – a fact that reinforces its reliability. In addition to lactose, quantification with the Chloramine-T method may also include other reducing sugars such as oligosaccharides with lactose terminals, which can be present in large and variable amounts in HM (Atkinson *et al.* 1980). Nevertheless, literature findings agree with our results. Specifically, the HMA

recorded lesser lactose concentrations than the reference method; however, in the mentioned studies, the latter did not involve the Chloramine-T method but an enzyme technique with a different analytical basis (Atkinson *et al.* 1980).

The advantages offered by the HMA are as follows: (1) requirement of a small sample volume of milk; (2) minimal training requirement; and (3) the HMA is easily transportable and needs only small volume of reactive. These advantages are supported by our findings and suggest that this method can easily be incorporated to HMBs for routine analysis of donor HM or mother's own milk and point-of-care analysis in the neonatal units. Using a volume sample <2 mL and in a running time of only 1 min, the HMA was able to determine the concentration of all three major nutrients (lipids, proteins and lactose) and compute the corresponding caloric value. In addition, the use of a single and easy-to-handle instrument considerably reduced the consumables needed for routine biochemical determinations and training of the technician. In comparison, the conventional laboratory techniques required a total volume of over 25 mL, with test duration of approximately 150 min and long-lasting training of the technician in each of the methods.

In the selection of methods for the present study, we initially chose the Röse Gottlieb method recommended by the International Dairy Federation for total fat quantification ([http://nmpf.org/washington\\_watch/labeling/international](http://nmpf.org/washington_watch/labeling/international)). However, the preliminary tests conducted in HM often caused formation of emulsions of milk and reagents. To avoid this inconvenience, the Gerber method was found more suitable (Kleyn *et al.* 2001). In addition, we used the Bradford (Bradford 1976) and Chloramine-T (Hinton & Macara 1927) techniques for protein and lactose, respectively. A thorough evaluation of these biochemical assays revealed their suitability for analysis of HM. It should be mentioned here that for assessing the linearity of the HMA technique, we eliminated the 1:4 dilution as the sensitivity of the instrument was insufficient to quantify such low concentrations of fat and proteins, while the analysis of lactose in this aliquot lost the linearity observed in the dilutions of greater concentration.

Of relevance, both our results and those of other authors (Menjo *et al.* 2009; Casadio *et al.* 2010) have found significant differences between both traditional and HMA methods relative to the macronutrient concentrations. Hence, the Gerber method for quantification of milk fat content consistently showed significantly lower concentrations than the HMA method. Both techniques showed the expected inter-individual variations inherent to HM, and the concentrations obtained with both procedures were within the ranges published for lipid concentrations in HM (Wojcik *et al.* 2009; Bauer & Gerss 2011; Moltó-Puigmartí *et al.* 2011). Although the differences obtained were statistically significant, a good correlation was observed among the data, suggesting that the differences between the methods could be obviated by readjusting the calibration of the analyser. Other authors have obtained similar results, comparing the analyser with other biochemical methods (Folch and Röse Gottlieb methods, respectively) (Menjo *et al.* 2009; Casadio *et al.* 2010). The protein concentrations obtained with both methods showed important differences on the order of 0.59 g per 100 mL, but with differences as high as 1.23 g per 100 mL in some of the samples. This striking difference is a relevant matter of concern as protein content of HM is a precluding condition to enrich HM. The analysis of these differences showed the Bradford method to yield significantly higher values than the HMA autoanalyser in all the samples analysed. Moreover, the linear correlation between the two techniques was low. As has been supported in the present study, the concentration of proteins in HM is generally more stable than the concentration of lipids. In this sense, the SD was low and similar for both methods despite the fact that the mean concentration reported by the Bradford technique doubled that obtained with HMA. It is important to mention that the concentrations obtained with the HMA autoanalyser were far lower than expected, according to the mean protein concentrations in HM documented in the literature (Wojcik *et al.* 2009), while the Bradford method yielded values within the expected range. Therefore, in the absence of certified samples of HM and considering the analytical parameters obtained with both methods, it seems reasonable to recommend adjustment and

calibration of the HMA before its use for quantification of milk protein content. Other authors have conducted similar studies but using a different reference technique (the Bradford method) (Casadio *et al.* 2010). Their results did not coincide with ours; however, although significant differences were recorded with respect to the HMA autoanalyser, the latter technique overestimated the concentration of proteins in HM as opposed to our findings (Casadio *et al.* 2010). Lactose concentration showed significant differences according to whether the HMA or traditional Chloramine-T technique was used. Hence, the HMA autoanalyser yielded comparatively lesser concentration in all the analysed samples with values close to 5 g per 100 mL in all cases. The HMA therefore appears to underestimate the reported lactose concentration in HM (Kunz *et al.* 2000). In contrast, the conventional laboratory method yielded values coincident with those expected for HM – a fact that reinforces its reliability. In addition to lactose, quantification with the Chloramine-T method may also include other reducing sugars such as oligosaccharides with lactose terminals, which can be present in large and variable amounts in HM (Kunz *et al.* 2000).

The principal strength of our study relies on the precision, linearity and reproducibility of the biochemical assays elected for determining milk macronutrients, which allowed critical comparison with results obtained with the IR HMA, rendering conclusions regarding the reliability of the latter valid. Limitations of the study include small sample size calculation and some missing observations that occurred due to lack of a sufficient milk volume to complete all the determinations in every sample.

We conclude that the use of autoanalysers such as the IR HMA appears to be more suitable for routine use in HMBs and neonatology units or milk banks. However, it should be underscored that routine calibration with a highly reliable standard is mandatory especially when used for fortification purposes in preterm infants. Although theoretical influence of such practice is apparently positive, further studies evaluating the benefits of incorporating routine milk analysis from milk banks and own mother's to preterm feeding protocols on nutritional outcome are needed.

## Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Amparo Ramón, RN, and Rosario Sirvent, RN, for their contribution in obtaining and processing the milk sample.

## Source of funding

This study was supported with grants RD008/0072/0022 from the Instituto Carlos III (Spanish Ministry of Science and Innovation) to MV and GE006-10 from the Conselleria de Sanitat i Consum (Autonomous Community of Valencia) to MG.

## Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

## Contributions

DS co-designed the study, analysed the data and performed the initial draft of the manuscript; MF performed the biochemical analysis and performed the statistical analysis; MG performed the MIR spectroscopy analysis and helped with the design of the study and helped with the initial draft of the manuscript; ET recruited milk donors in the NICU, collected milk samples and performed MIR spectroscopy analysis; MV designed the study, reviewed the statistical analysis and figures, and wrote the final draft of the manuscript.

## References

- American Academy of Pediatrics (2012) Policy Statement. Breastfeeding and the use of human milk. *Pediatrics* **129**, e627–e641.
- Andersson G.H., Atkinson D.S. & Bryan M.H. (1981) Energy and macronutrient content in human milk during early lactation from mothers living birth prematurely and a term. *American Journal of Clinical Nutrition* **34**, 258–265.
- Arnold L.D. (2002) The cost-effectiveness of using banked donor milk in the neonatal intensive care unit: prevention of necrotizing enterocolitis. *Journal of Human Lactation* **18**, 172–177.
- Arslanoglu S., Moro G., Ziegler E.E. & the WAPM Working Group on Nutrition (2010) Optimization of human milk fortification for preterm infants: new concepts and recommendations. *Journal of Perinatal Medicine* **38**, 233–238.
- Atkinson S.A., Bryan M.H. & Anderson G.H. (1980) Human milk: comparison of the nitrogen composition in milk from mothers of premature and full-term infants. *American Journal of Clinical Nutrition* **33**, 811–815.
- Bauer J. & Gerss J. (2011) Longitudinal analysis of macronutrients and minerals in human milk produced by mothers of preterm infants. *Clinical Nutrition* **30**, 215–220.
- Bland J.M. & Altman D.G. (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**, 307–310.
- Bokor S., Koletzko B. & Decsi T. (2007) Systematic review of fatty acid composition of human milk from mothers of preterm compared to full-term infants. *Advances Nutrition and Metabolism* **51**, 550–556.
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248–254.
- Casadio Y.S., Williams T.M., Lai C.T., Olsson S.E., Hepworth A.R. & Hartman P.E. (2010) Evaluation of a mid-infrared analyzer for the determination of the macronutrient composition of human milk. *Journal of Human Lactation* **26**, 376–383.
- Corvaglia L., Battistini B., Paoletti V., Aceti A., Capretti M.G. & Faldella G. (2008) Near-Infrared reflectance analysis to evaluate the nitrogen and fat content of human milk in neonatal intensive care units. *Archives Diseases of Children Fetal Neonatal Edition* **93**, F372–F375.
- European Milk Bank Association (2012) Available at: <http://www.europeanmilkbanking.com> (Accessed 1 April 2012).
- Henderson G., Anthony M.Y. & McGuire W. (2007) Formula milk versus maternal breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (4), CD002972.
- Hinton C.L. & Macara T. (1927) The determination of aldose sugars by means of chloramine-T, with special reference to the analysis of milk products. *Analyst* **52**, 668–688.
- Italian Association of Human Milk Bank (2010) Guidelines for the establishment and operation of a donor human milk bank. *Journal of Maternal Fetal and Neonatal Medicine* **23**, 1–20.
- Jensen R.G. & Clark R.M. (1984) Methods of lipids analysis. *Journal of Paediatric Gastroenterology and Nutrition* **3**, 296–299.

- Kleyn D.H., Lynch J.M., Barbano D.M., Bloom M.J. & Mitchel M.W. (2001) Determination of fat in raw and processed milks by the Gerber method: collaborative study. *Journal of the Association of Analytical Communities* **84**, 1499–1508.
- Krouwer J.S. (2008) Why Bland-Altman plots should use  $X$ , not  $(Y + X)/2$  when  $X$  is a reference method. *Statistics in Medicine* **27**, 778–780.
- Kunz C., Rudloff S., Baier W., Klein N. & Strobel S. (2000) Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects. *Annual Review of Nutrition* **20**, 699–722.
- Lucas A., Gibas J.A.H., Lyster R.L. & Baum J.D. (1978) Creamatocrit: simple clinical technique for estimating fat concentration and energy value of human milk. *British Medical Journal* **1**, 1018–1020.
- Menjo A., Mizuno K., Murase M.Y., Nishida Y., Taki M., Itabashi K. *et al.* (2009) Bedside analysis of human milk for adjustable nutrition strategy. *Acta Paediatrica* **98**, 380–384.
- Michaelsen K.F., Pedersen S.B., Skaftø L., Jaeger P. & Peitersen B. (1988) Infrared analysis for determining macronutrients in human milk. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* **2**, 229–235.
- Moltó-Puigmartí C., Castellote A.I., Carbonell-Estrany X. & López-Sabater M.C. (2011) Differences in fat content and fatty acid proportions among colostrum, transitional, and mature milk from women delivering very preterm, preterm, and term infants. *Clinical Nutrition* **30**, 116–123.
- Quigley M., Henderson G., Anthony M.Y. & McGuire W. (2007) Formula milk versus donor breast milk for feeding preterm or low birth weight infants. *Cochrane Database of Systematic Reviews* (4), CD002971. DOI: 10.1002/14651858.CD002971.pub2.
- Sauer C.W. & Kim J.H. (2001) Human milk macronutrient analysis using point-of-care near infrared spectrophotometry. *Journal of Perinatology* **31**, 339–343.
- Silvestre D., Martínez C., Lagarda M.J., Brines J., Farré R. & Clemente G. (2001) Copper, iron and zinc contents in human milk during the first three months of lactation. *Biology Trace Elements Research* **80**, 1–11.
- Wojcik K.Y., Rechtman D.J., Lee M.L., Montoya A. & Medo E.T. (2009) Macronutrient analysis of a nationwide sample of donor breast milk. *Journal of the American Dietetic Association* **109**, 137–140.
- World Health Organization (WHO) (2011) Available at: [http://www.who.int/topics/infantfeeding\\_recomendation/en/index.html](http://www.who.int/topics/infantfeeding_recomendation/en/index.html) (Accessed 12 December 2011).



Original

## Estabilidad de la capacidad antioxidante y pH en leche humana refrigerada durante 72 horas: estudio longitudinal

M. Miranda<sup>1</sup>, M. Gormaz<sup>2</sup>, F. J. Romero<sup>1</sup> y D. Silvestre<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad CEU-Cardenal Herrera. <sup>2</sup>Unidad de Neonatología. Hospital Universitario La Fé. Valencia. España.

### Resumen

La leche materna es la vía óptima de alimentación del lactante durante, al menos, los primeros 6 meses de vida. Su elección se basa en el aporte de nutrientes y, de forma especial, en proporcionar al neonato diversos compuestos de acción beneficiosa que mejoran su crecimiento y le protegen frente a patologías propias de esta etapa. Estas propiedades de la leche materna justifican los procesos de manipulación previos a su ingesta, con el fin de promover y asegurar su seguimiento, tanto a nivel casero como a nivel hospitalario, de mayor importancia en lactantes prematuros y/o de bajo peso, por su destacada vulnerabilidad, a pesar de que durante estos procesos se pueden perder parcialmente algunas de sus propiedades. Es por ello que interesa conocer el efecto que los tratamientos aplicados a la leche humana ejercen sobre sus principales cualidades, como su capacidad antioxidante.

**Objetivo:** Este trabajo analiza la estabilidad de la capacidad antioxidante de la leche humana durante su almacenamiento a 4°C, de forma longitudinal desde su extracción hasta las 48 horas de refrigeración, así como las variaciones del pH.

**Método:** Se analiza la leche madura procedente de 30 mujeres sanas. El poder antioxidante de la leche se evalúa a través de los parámetros: capacidad antioxidante total y concentración de malondialdehído. Los resultados obtenidos muestran que el pH disminuye de forma creciente desde el inicio del almacenamiento, mientras que la capacidad antioxidante, con diferente comportamiento según el parámetro evaluador considerado, permanece estable durante las primeras 24 horas, a partir de las cuales se presentan cambios significativos.

**Conclusiones:** Cuando es preciso recurrir a la extracción y refrigeración de la leche antes de su ingesta es recomendable minimizar el tiempo de almacenamiento, procurando que no supere las 24 horas si se quiere preservar del estrés oxidativo.

(Nutr Hosp. 2011;26:722-728)

DOI:10.3305/nh.2011.26.4.4871

Palabras clave: Leche humana. Capacidad antioxidante. Refrigeración. Malondialdehído. pH.

**Correspondencia:** Dolores Silvestre Castelló.  
Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología.  
Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad CEU- Cardenal Herrera.  
Edificio Seminario, s/n.  
46113 Moncada. Valencia. España.  
E-mail: dsilves@uch.ceu.es

Recibido: 17-V-2010.  
1.ª Revisión: 24-VI-2010.  
Aceptado: 22-VII-2010.

### STABILITY OF THE ANTIOXIDANT CAPACITY AND pH OF HUMAN MILK REFRIGERATED FOR 72 HOURS: LONGITUDINAL STUDY

#### Abstract

Maternal milk is the optimal feeding way for the infant at least for the first six months of life. Its properties include nutrients intake and, particularly, to provide the infant with several beneficial compounds improving his growth and protecting him from the diseases typical of this time period. These properties justify the manipulating processes before its intake in order to promote and warrant the adherence to it, both at the hospital and at home, being more important in premature infants and/or with low birth weight given their increased vulnerability, in spite of the fact that during these processes some of its properties may be partially lost. There exist, therefore, an interest in knowing the impact of the procedures applied to human milk on its qualitative properties, such as the antioxidant capacity.

**Objective:** This work assesses the stability of the antioxidant capacity of human milk during its storage at 4°C, longitudinally from its extraction until 48 h of refrigeration, as well as the pH changes.

**Method:** the milk from 30 healthy women was analyzed. The milk's antioxidant capacity was assessed by the following parameters: total antioxidant capacity and level of malondialdehyde. The results obtained showed that pH decreases gradually from the storage beginning, whereas the antioxidant capacity remains constant for the first 24 hours, with a different result depending on the parameter used, and thereafter significant changes were observed.

**Conclusions:** In case of needing extraction and storage of maternal milk before its consumption, the storage time should be minimized, preferably less than 24 hours in order to preserve the oxidative stress.

(Nutr Hosp. 2011;26:722-728)

DOI:10.3305/nh.2011.26.4.4871

Key words: Human milk. Antioxidant capacity. Refrigeration. Malondialdehyde. pH.

## Introducción

La leche materna es la mejor opción en la alimentación del lactante, al menos, durante los primeros seis meses de vida. Los beneficios que aporta exceden al mero aporte de nutrientes, contribuyendo a la mejora en los sistemas defensivos y de protección del lactante frente a diversos agentes agresivos, origen de numerosas patologías. Estas propiedades son de especial importancia en la alimentación del lactante prematuro y/o de bajo peso, que por su inmadurez presenta mayor vulnerabilidad frente a dichos agentes.

Los componentes activos no nutricionales de la leche humana identificados actualmente presentan diversa naturaleza y han sido identificados como: células, oligosacáridos, proteínas, enzimas, inmunoglobulinas, factores de crecimiento, hormonas y sistemas antioxidantes<sup>1</sup>. Estos elementos mantienen su integridad tras el proceso digestivo y muestran actividad en la mucosa del lactante donde desempeñan su función, evitando la acción agresiva de microorganismos y otros agentes tóxicos<sup>2</sup>.

A pesar del reconocido y unánime interés por prolongar la lactancia<sup>3</sup>, son diversas las causas que llevan a un abandono temprano, entre ellas se encuentra la incorporación de la madre a la vida laboral. En esta situación, la extracción de la leche y su almacenamiento en el domicilio permite el seguimiento de la lactancia incluso en la ausencia de la madre. Este proceder es de habitual seguimiento por la mayor parte de mujeres motivadas por continuar su lactancia a pesar de su alta laboral u otras circunstancias que impidan la alimentación directa a pecho. A su vez, esta práctica es empleada en el sistema hospitalario para la alimentación de lactantes ingresados en UCI con leche de madres donantes, procesada y almacenada en Bancos de Leche, de creciente y deseable implantación a nivel mundial, también en España.

Tal manipulación puede conducir a pérdidas en las propiedades nutricionales y funcionales de la leche, menguando parcialmente los beneficios que proporcionan y que justifican su calidad<sup>4,5</sup>. Estas alteraciones han sido estudiadas por numerosos autores, aunque no suficientemente y, en la actualidad, todavía no son del todo conocidas. Así, aunque se conoce en parte la estabilidad de la capacidad antioxidante de la leche humana cuando ésta se mantiene en almacenamiento en frío, no se han encontrado estudios previos que evalúen su evolución de forma longitudinal durante la refrigeración, ni su posible relación con otros parámetros posiblemente relacionados como el pH.

La peroxidación lipídica es uno de los procesos de oxidación más importantes que se desencadenan en el organismo, por acción directa del oxígeno o de otros agentes oxidantes sobre los ácidos grasos insaturados de la membrana celular, con daños directos sobre la membrana y orgánulos celulares, liberación de radicales libres y formación de productos con carácter tóxico como el malondialdehído (MDA). El control de su

evolución y sus dañinas consecuencias es función, en el organismo, del sistema de antioxidantes obtenidos por vía endógena y fortalecido por el aporte dietético de los mismos.

El riesgo de estrés oxidativo es especialmente elevado en los neonatos, y sobretodo en el caso de prematuros, debido a la inmadurez fisiológica de sus sistemas de defensa y a su exposición a altas concentraciones del oxígeno inspirado, consecuencia de la deficiente gestión de los pulmones en temprana formación<sup>6</sup>.

Los radicales de oxígeno pueden contribuir al desarrollo de numerosas enfermedades propias de neonatos prematuros, como la enfermedad pulmonar crónica, enterocolitis necrotizante, retinopatía, hemorragia intraventricular y periventricular, entre otras<sup>7</sup>. Así, la protección demostrada en los lactantes alimentados con leche materna frente a la enfermedad enterocolitis necrotizante se relaciona con su actividad antioxidante, lo que justifica el interés en el empleo de leche de bancos para su alimentación<sup>7</sup>.

La oxidación de la grasa láctea requiere, como paso previo, la hidrólisis de los triglicéridos constituyentes y la liberación de los ácidos grasos, por acción de las lipasas, enzimas presentes y activas en leche humana, con el consiguiente descenso del pH. Lo que podría relacionar las variaciones del pH y el estrés oxidativo de la leche.

El presente estudio tiene por objeto analizar la evolución del estrés oxidativo de la leche humana cuando se mantiene almacenada en refrigeración a lo largo de 48 horas, condiciones recomendadas en los protocolos de manipulación, eligiendo como parámetro evaluador la capacidad antioxidante global de la leche y la concentración de malondialdehído, producto de la peroxidación lipídica y por ello considerado un buen marcador del proceso oxidativo, relacionando su contenido con el los cambios mostrados en el pH.

## Objetivos

Analizar, de forma longitudinal, la evolución de la capacidad antioxidante de la leche humana, evaluada mediante: capacidad antioxidante total (CAT) y la concentración de malondialdehído (MDA), así como el pH cuando se almacena en refrigeración a 4°C durante: 0 h, 12 h, 24 h, 36 y 48 h. Estudiar la posible relación entre ambos parámetros.

## Material y métodos

### *Mujeres donantes*

El estudio se llevó a cabo con leche donada por 30 mujeres sanas, no fumadoras que acudían al Box de Lactancia de la Unidad de Neonatos del Hospital Universitario La Fé (Valencia) para la extracción de su leche con el fin de alimentar a su hijo allí ingresado.



Con la colaboración del personal técnico del box se seleccionaban las mujeres donantes de acuerdo a su disponibilidad y características, éstas eran informadas sobre el interés y objeto del estudio y, en su caso, daban su consentimiento para participar en él. La recogida de muestras se llevó a cabo con la aprobación de la Comisión Ética del Hospital.

#### *Recogida de muestras*

Se analizaron 30 muestras de leche madura, recogidas bajo condiciones estandarizadas con el fin de eliminar al máximo las fuentes de variabilidad entre ellas<sup>8</sup>. La extracción se llevó a cabo, bajo la supervisión del personal técnico del box de lactancia del citado hospital, en horario de mañana entre las 9 y las 13 h, con ayuda de sacaleches automático con regulador de vacío (MAMILAT SM 122), directamente sobre recipiente de polipropileno, evitando así su contaminación. Tras la extracción, las muestras se trasladaban inmediatamente a la Universidad CEU-Cardenal Herrera, ubicada en Moncada (Valencia), para su análisis, en todo momento bajo condiciones de refrigeración y en oscuridad, con el fin de evitar el proceso oxidativo durante este breve periodo.

#### *Procesado de las muestras*

En base a estudios previos que confirmaron la estabilidad de la capacidad antioxidante de la leche humana cuando ésta se mantiene en congelación a -20°C durante 10 días<sup>9</sup>, el procesado de las muestras se diseñó de la siguiente forma: cada muestra se dividía en 5 alícuotas de unos 3-4 mL cada una y se identificaban. Una de ellas se sometía a control inmediato, leche fresca, y el resto para su análisis tras mantener el refrigeración a 4°C durante 12 h, 24 h, 36 h y 42 h, respectivamente. A cada tiempo se procedía a la determinación del pH y posterior congelación de la alícuota a -20°C. En un tiempo inferior a 5 días se descongelaban y se sometían al resto de determinaciones según los métodos seguidamente indicados.

#### *Ensayos bioquímicos*

La determinación de pH se realizó en todas las muestras, por medida potenciométrica con pH-metro Basic 20 (Crisol).

La concentración de MDA se determinó en las cinco alícuotas de 16 muestras, como producto de peroxidación lipídica por cromatografía líquida de acuerdo a la modificación sobre el método de Richard y cols.<sup>10</sup> puesto a punto previamente<sup>11</sup>.

La capacidad antioxidante total se evaluó en las cinco alícuotas de 14 muestras mediante el kit comercial (Antioxidant Assay kit (Cayman Chemical Co. Ann Arbor, MI)). El ensayo se basa en la cuantificación

de la capacidad de los antioxidantes en la muestra por inhibición de la oxidación del radical ABTS + y comparación con la del Trolox, un análogo del tocoferol soluble en agua, y se cuantificó como milimoles equivalentes de Trolox.

#### *Análisis estadístico*

El estudio estadístico de los resultados obtenidos se realizó con ayuda del programa Statgraphics Plus 5.0. Las diferencias estadísticas se consideran con una probabilidad del 95% ( $p < 0,05$ ).

Los valores se expresan en valor medio  $\pm$  desviación estándar. La normalidad de las poblaciones estudiadas se confirmó mediante la aplicación del test de Kolmogorov ( $p > 0,100$ ), con el fin de poder analizar los datos con análisis de la varianza (ANOVA).

El efecto del tiempo de permanencia en refrigeración se evaluó teniendo en cuenta la variabilidad debida a la mujer donante, efectuando para ello un ANOVA de dos factores y posterior test de LDS (test de mínima diferencia significativa, prueba empleada por el programa informático Statgraphics para localizar las diferencias significativas tras la aplicación de la ANOVA). La relación entre parámetros se evaluó mediante regresión lineal.

#### **Resultados**

Los valores medios de los parámetros evaluados, para cada etapa de refrigeración considerada se muestran en la tabla I.

Todas las poblaciones estudiadas, en los tres parámetros analizados, mostraron una distribución normal, lo que permitió aplicar ANOVA multifactorial como pruebas estadística.

El estudio longitudinal de la evolución de los parámetros mostró los siguientes resultados:

Los valores de pH en leche fresca presentaron una amplia variabilidad, con valor máximo de 7,68 y mínimo de 7,07, siendo la mediana 7,56.

El pH de la leche presenta variaciones altamente significativas para los dos factores analizados: mujer donante y tiempo de almacenamiento ( $p = 0,0000$ , en ambos). El pH desciende desde leche fresca hasta el final del estudio de forma progresiva y significativa entre cualquiera de las etapas consideradas, como puede observarse en la figura 1. Así, el pH es máximo en leche fresca ( $7,50 \pm 0,16$ ) y, a partir de este momento, desciende bruscamente, presentando en cada una de las etapas un valor significativamente mayor que en la siguiente, obteniendo el mínimo valor de pH a las 48 horas de extracción ( $6,70 \pm 0,19$ ). El pH a cada tiempo de refrigeración es significativamente inferior al de la etapa anterior, teniendo en cuenta las diferencias también significativas, que presenta el pH de las madres donantes entre ellas.

**Tabla I**  
pH, concentración de MDA y capacidad antioxidante total, en leche fresca y en leche mantenida a 4° C durante 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. (Valor medio ± desviación estándar)

Tiempo de almacenamiento	pH (21 valores = todos)	MDA (µM)	CAT (mmoles equivalentes de Trolox)
Fresca	7,50 ± 0,16	1,15 ± 0,07	68,55 ± 15,74
12 h	7,28 ± 0,15	1,36 ± 0,23	67,48 ± 18,58
24 h	7,09 ± 0,22	1,70 ± 0,49	63,07 ± 14,87
36 h	6,83 ± 0,26	2,50 ± 0,32	67,78 ± 17,81
48 h	6,70 ± 0,19	2,47 ± 1,02	63,02 ± 20,56

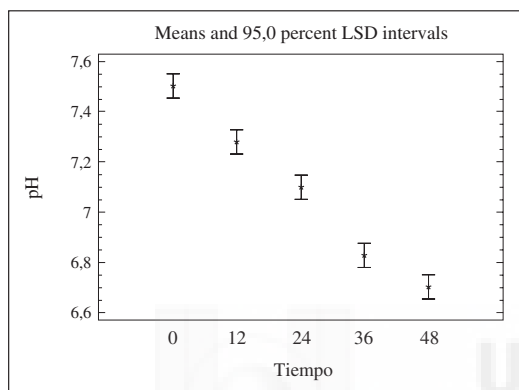


Fig. 1.—pH de leche humana: evolución longitudinal. Leche fresca (punto 0) y leche mantenida a 4° C durante 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. Intervalos para la media. Test LSD.

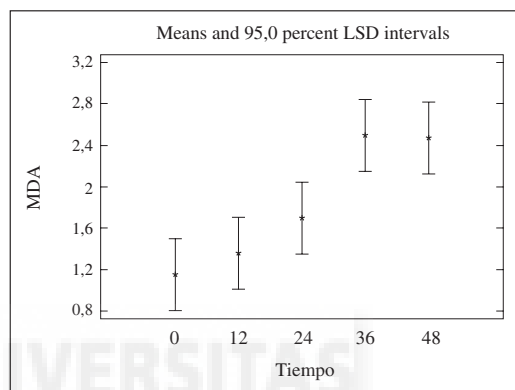


Fig. 2.—Concentración de malondialdehído (MDA, µM) en leche humana: evolución longitudinal. Leche fresca (0 h) y leche mantenida a 4° C durante 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. Intervalos para la media. Test LSD.

Los valores de MDA leche fresca presentaron una amplia variabilidad, con valor máximo de 1,09 y mínimo de 1,28, siendo la mediana de 1,15.

En la tabla I puede comprobarse el incremento de la concentración de MDA que se obtuvo a lo largo del estudio. La aplicación del ANOVA multifactorial indica que los cambios presentados en este marcador de oxidación lipídica son estadísticamente significativos en relación al tiempo de almacenamiento en refrigeración ( $p = 0,0015$ ), pero no respecto a la variabilidad encontrada entre las mujeres donantes (NS). Las diferencias existentes entre las etapas analizadas se evidenciaron por aplicación posterior del test LDS (fig. 2). Como puede observarse en la figura 2, la concentración de MDA aumenta ligeramente desde el inicio, en leche fresca ( $1,15 \pm 0,07$  mM), aunque este incremento no es significativo durante las primeras 24 horas de refrigeración. A partir de este punto, si la refrigeración se prolonga hasta las 36 horas, la concentración obtenida de MDA alcanza valor  $2,50 \pm 0,49$  mM, aumento significativo estadísticamente respecto a los anteriores, permaneciendo constante a partir de aquí hasta el final del estudio.

Al igual que los parámetros anteriormente evaluados, la CAT obtenida en leche fresca presentó una amplia variabilidad, con valor máximo de 90,95 y mínimo de 39,45, siendo la mediana 73,80. Como puede

comprobarse en la tabla I, la determinación de la capacidad antioxidante global de la leche humana presenta una gran variabilidad en todas las poblaciones analizadas. El análisis estadístico multifactorial indica variaciones significativas entre las mujeres donantes ( $p = 0,0000$ ), sin embargo no los son en relación al tiempo de almacenamiento (NS), indicando que la capacidad antioxidante global permanece sin cambios significativos desde el inicio, leche fresca hasta el final del estudio, tras refrigeración durante 48 horas, tal como muestra la figura 3.

La posible relación entre los parámetros evaluadores de la capacidad antioxidante de la leche y el pH de la misma se analizó por aplicación de un análisis de regresión lineal.

Los resultados encontrados no mostraron relación significativa entre el pH y la CAT en leche humana. Sin embargo, el descenso en el pH sí se relaciona, inversamente, con la concentración de MDA según la siguiente ecuación:

$$\text{MDA} = 11,3058 - 1,35819 \cdot \text{pH}$$

En la figura 4 se muestra la representación del análisis de regresión lineal entre los valores de pH y MDA obtenidos en la evolución longitudinal en leche

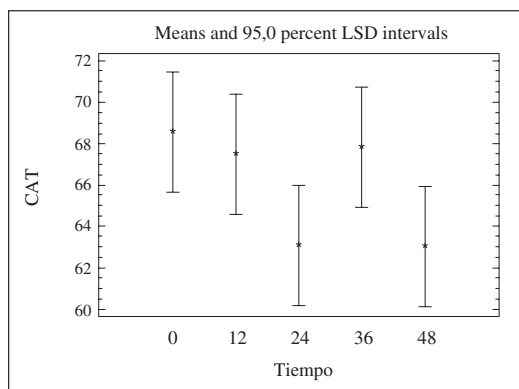


Fig. 3.—Capacidad antioxidante total de leche humana (CAT, mmoles equivalentes de Trolox): evolución longitudinal. Leche fresca (0 h) y leche almacenada a 4° C durante 12 h, 24 h, 36 h y 48 h. Intervalos para la media. Test LSD.

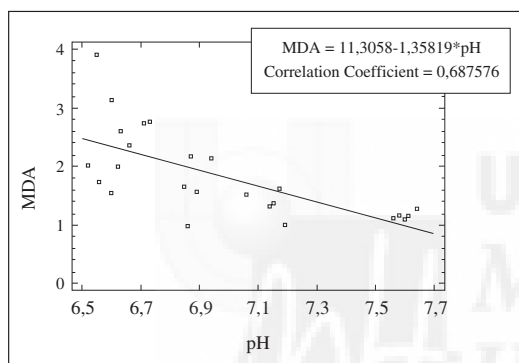


Fig. 4.—Correlación entre concentración de MDA y pH en leche humana: evolución longitudinal en refrigeración a tiempo 0 h, 12 h, 24 h, 36 h y 48 h.

humana refrigerada. El coeficiente de correlación del análisis ( $R = -0,6876$ ) indica que entre ambas variables existe una relación inversa de fuerza moderada. Pudiendo afirmar que dicha relación entre ambos parámetros es altamente significativa, con intervalo de confianza del 95%, ( $p = 0,0001$ ).

## Discusión

Cuando es necesario proceder a la refrigeración de la leche materna previo a su ingesta, es importante cuidar las condiciones y el periodo de mantenimiento con el fin de minimizar su alteración y las pérdidas de sus cualidades. Entre las propiedades que interesa preservar destaca la capacidad antioxidante, como factor de protección frente a patologías propias del neonato, a las que está especialmente expuesto dada su inmadurez de órganos y sistemas<sup>9,12</sup>. La oxidación de los lípidos de la leche origina productos de reacción que contribuyen a la formación de radicales y derivados reactivos del

oxígeno que parece pueden contribuir en el desarrollo de patologías como enterocolitis necrotizante o displasia broncopulmonar, entre otras<sup>13</sup>.

Diversos autores han evaluado previamente la estabilidad de esta propiedad de la leche humana durante su manipulación, sin embargo sus resultados no son concluyentes ni en muchas ocasiones contrastables entre ellos, por considerar diversas condiciones de almacenamiento o evaluar parámetros diferentes<sup>6,9</sup>.

La elección de la concentración de MDA como evaluador del estado oxidativo de la leche, se justifica no sólo 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.

Estudios anteriores han mostrado la presencia de MDA en leche humana recién extraída y su incremento significativo cuando se almacena 48 horas<sup>11</sup>, sin embargo se desconocía la evolución de este aumento y a partir de qué tiempo se producía.

Los resultados obtenidos han corroborado la presencia de MDA en todas las muestras frescas analizadas, con baja variabilidad entre ellas, posible consecuencia de la selección de las donantes entre mujeres no fumadoras, ya que estudios previos han demostrado la diferente concentración de MDA entre mujeres fumadoras y no fumadoras<sup>12,13</sup>.

Como puede observarse en la figura 2, el contenido de MDA en leche fresca es mínimo, a partir de aquí el tiempo de almacenamiento conlleva un incremento, suave en las primeras 24 horas, a partir de las cuales la concentración de MDA muestra un marcado aumento con significación estadística, así, a las 36 horas de almacenamiento la concentración de MDA es significativamente mayor, manteniéndose estable a partir de aquí. Este resultado coincide y completa el obtenido en estudios anteriores<sup>9</sup>, corroborando la inestabilidad de la leche, respecto a la concentración de MDA tras almacenamiento 48 horas en refrigeración pero detallando, además, que esta alteración se produce en etapas previas, concretamente a las 36 horas, siendo estable hasta este momento.

El estudio de la capacidad antioxidante de la leche se completa con la evaluación de la capacidad antioxidante global de la leche. En este parámetro confluye la contribución a esta propiedad de numerosos componentes de la leche, algunos identificados y considerados en trabajos de otros autores, como glutathion (GSH)<sup>14</sup>, enzima glutathion peroxidasa<sup>9,15</sup>, enzima superóxido dismutasa<sup>15</sup> y vitaminas antioxidantes C, A y E, entre otros. Este parámetro ha sido anteriormente evaluado por otros autores<sup>8</sup> y por nuestro equipo<sup>16</sup> en otros estudios en leche humana. Los resultados obtenidos presentan una gran variabilidad entre las mujeres donantes, estas variaciones posiblemente puedan estar enmascarando el efecto de los otros factores afectantes, como la permanencia a 4°C. Así, en este trabajo no se han encontrado variaciones significativas en el poder antioxidante total de la leche durante

las 48 horas de almacenamiento. Este resultado discrepa, o al menos no era de esperar dado el conocido efecto que la permanencia de la leche humana en estas condiciones tiene sobre la estabilidad y actividad de algunos de los compuestos con acción antioxidante, contribuyentes a esta propiedad<sup>8,9,17,18</sup>.

La acidez de la leche es un parámetro de control de calidad muy valorado en la manipulación en bancos de leche, determinándose como grados dórnica o como pH. El empleo de la titulación dórnica es de mayor uso y frecuencia<sup>19</sup>.

Es conocida la caída del pH de leche humana durante su almacenamiento<sup>8,20,21</sup>, tanto si el almacenamiento se realiza en refrigeración como en congelación. Nuestro trabajo obtiene resultados concordantes con dichos estudios. En leche fresca se han encontrado pH entre 7,07 y 7,68, valores máximo y mínimo ( $7,50 \pm 0,16$  como media), datos ligeramente superiores a los publicados previamente<sup>23</sup> e incluidos en el rango obtenido por otros autores<sup>21</sup>. Cuando la leche se almacena en frío, desde el inicio se presenta una marcada y significativa disminución del pH, así a las 24 horas de almacenamiento el pH medio es de  $7,09 \pm 0,22$ , habiendo pues descendido -0,41 unidades, respecto al valor inicial. El trabajo publicado por Hedge y Vikiyath, 2007<sup>22</sup>, realiza el seguimiento del pH durante este periodo, mostrando similar comportamiento del pH aunque con menor pendiente de descenso (-0,17 unidades de pH de diferencia) entre leche refrigerada 24 h y leche fresca). Resultados así mismo concordantes con otros autores<sup>8,20</sup>. Nuestro estudio prolonga el periodo de almacenamiento durante más tiempo, observando que la caída de pH se mantiene bruscamente durante todo el periodo evaluado, alcanzando el mínimo valor ( $6,70 \pm 0,19$ ) a las 48 h. Igualmente esta bajada de pH se prolonga en otros estudios hasta tiempos más largos como 8 días de refrigeración<sup>18</sup>.

Así, estos resultados confirman que la leche humana aumenta su acidez desde el inicio de su refrigeración, tanto más cuanto mayor es el tiempo de mantenimiento.

Al margen de la relación que el aumento de la acidez de la leche pueda mantener con el desarrollo de microorganismos, relación valorada en algunos estudios<sup>21</sup>, el aumento de acidez desencadenado durante la refrigeración tiene su origen en el incremento de ácidos grasos libres que conlleva la actividad de las enzimas lipasas presentes en la leche y activas a pesar de las bajas temperaturas, incluso en congelación<sup>22</sup>. La actividad lipasa es mayor y con ello el descenso de pH si la leche se almacena a temperatura ambiente entre 15 a 25°C<sup>25</sup>.

El aumento de ácidos grasos libres, especialmente insaturados registrado en diversos trabajos<sup>12,24</sup>, puede llevar a un aumento del proceso oxidativo y con ello la formación de productos de oxidación como MDA. En base a ello, en este trabajo se ha tratado de relacionar las variaciones entre ambos parámetros: pH y concentración de MDA, no habiendo encontrado estudios pre-

vios que traten de relacionarlas. Los resultados obtenidos confirman una relación lineal inversa entre ambas con fuerte significación estadística, de forma que el descenso de pH conlleva un aumento en la concentración de MDA.

Sin embargo no hay relación entre la variación del pH con la capacidad total antioxidante, aunque este resultado parece poco concluyente dada la elevada variabilidad interindividual de la CAT, lo que impide sacar conclusiones al respecto y precisa, para su confirmación, nuevos estudios con mayor número de muestras.

En base a los resultados expuestos y con el fin de paliar estas modificaciones parece aconsejable inactivar las enzimas lipasas, desencadenantes de estas alteraciones con la liberación de ácidos grasos de sus estructuras originales en los triglicéridos, con el tratamiento térmico como la pasteurización<sup>25</sup>.

Los resultados obtenidos en este trabajo justifican la recomendación de disminuir en lo posible el tiempo de almacenamiento de leche en refrigeración. Cuando la mujer debe proceder a almacenar su leche antes de la ingesta del lactante, el periodo no debería superar las 24 horas con el fin de mantener la integridad de su componente lipídico y evitar sus alteraciones.

## Agradecimientos

Financiado por el Programa de Investigación Cooperación-Santander (PRCEU-UCH/COP01/08) de la Universidad CEU-Cardenal Herrera.

## Referencias

1. Baró L, Jiménez J, Martínez-Férez J, Boza JJ. Componentes biológicamente activos de la leche materna. *Ars Pharmaceutica* 2001; 42: 21-38.
2. Klemola T, Savilahti E, Leinikki P. Mumps IgA antibodies are not absorbed from human milk. *Acta Paediatr Scand* 1986; 75: 230-232.
3. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr19/es/index.html>. (fecha de consulta 11 de mayo de 2010).
4. Silvestre D, Ferrer E, Gaya J, Jareño E, Miranda M, Muriach M, Romero FJ. Available lysine content in human milk: stability during manipulation prior to ingestion. *Biofactors* 2006; 26: 71-79.
5. Lawrence RA. Storage of human milk and the influence of procedures on immunological components of human milk. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 88: 14-18.
6. Korchazhkina O, Jones E, Czaundera M, Spencer SA. Effects of exclusive formula or breast milk feeding on oxidative stress in healthy preterm infants. *Arch Dis Child* 2006; 91: 327-329.
7. Thibeault DW. The precarious antioxidant defenses of the preterm infant. *Am J Perinatol* 2000; 17: 167-181.
8. Silvestre D, Lagarda MJ, Farré R et al. A study of factors that may influence the determination of copper, iron, and zinc in human milk during sampling and in simple individuals. *Biol Trace Elem Res* 2000; 76: 217-227.
9. Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Bosch-Morell F, Romero FJ, Silvestre D. Oxidative status of human milk and its variations during cold storage. *Biofactors* 2004; 20: 129-137.
10. Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High performance liquid chromatography separation of malondialdehyde thibarbituric

- acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 1992; 577: 9-18.
11. Romero MJ, Bosch-Morell FJ, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 993-997.
  12. Van Zoeren-Grobbe D, Moison RM, Ester WM, Berger HM. Lipid peroxidation in human milk and infant formula: effect of storage, tube feeding and exposure to phototherapy. *Acta Paediatr* 1993; 82: 645-649.
  13. Ermis B, Yildirim A, Ors R, Tastekin A, Ozkan B, Akcay F. Influence of smoking on serum and milk malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and antioxidant potential levels in mothers at the postpartum seventh day. *Biol Trace Elem Res* 2005; 105: 27-36.
  14. Ankrah N, Appiah-Opong R and Dzokoto C. Human breastmilk storage and the glutathione content. *J Trop Pediatr* 2000; 46: 111-113.
  15. L'Abbe MR and Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 month of lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31: 270-274.
  16. Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jereño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr* 2008; 97: 107-114.
  17. Turoli D, Testolin G, Zanini R, Bellu R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr* 2004; 93: 1569-1574.
  18. Buss IH, McGill F, Darlow BA, Winterbourn CC. Vitamin C is reduced in human milk after storage. *Acta Paediatr* 2001; 90: 813-815.
  19. <http://www.redeBLH.fiocruz.br> (fecha consulta 11 de mayo de 2010).
  20. Ogundele MO. Effects of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Br J Biomed Sci* 2002; 59: 205-211.
  21. Hedge AM, Vikyath R. Cariogenic potential of stored human milk—an in-vitro study. *J Clin Pediatr Dent* 2007; 32: 27-32.
  22. Lavine M and Clark RM. Changing patterns of free fatty acids in breast milk during storage. *J Pediatr Gastroenterol and Nutr* 1987; 6: 769-774.
  23. Hamosh M, Ellis LA, Pollock DR, Henderson TR, Hamosh P. Breastfeeding and the working mother: effect of time and temperature of short-term storage on proteolysis, lipolysis, and bacterial growth in milk. *Pediatrics* 1996; 97: 492-498.
  24. Lepri L, Del Bubba M, Maginni R, Donzelli GP, Galvan P. Effect of pasteurization and storage on some components of pooled human milk. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997; 19: 1-10.
  25. Henderson TR, Fay TN, Hamosh M. Effect of pasteurization on long chain polyunsaturated fatty acid levels and enzyme activities of human milk. *J Pediatr* 1998; 132: 876-878.





# Human Milk Bactericidal Properties: Effect of Lyophilization and Relation to Maternal Factors and Milk Components

\*Jaime Salcedo, †Maria Gormaz, ‡Maria C. López-Mendoza, \*Elisabetta Nogarotto, and §Dolores Silvestre

## ABSTRACT

**Objective:** Lyophilization appears to be a viable method for storing human milk, assuring no microbiological contamination and preserving its health benefits and antibacterial properties. The aim of the study is to evaluate and compare the effects of different storage methods (lyophilization and freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  and  $-80^{\circ}\text{C}$ ) and maternal factors (gestational length or time postpartum) upon the microbiological contents and bactericidal activity of human milk. The possible relation between bactericidal activity and the content of certain nutrients and functional components is also investigated.

**Methods:** Microbiological content, bactericidal activity, sialic acid, and ganglioside contents, as well as protein, fat, and lactose concentrations were assessed in 125 human milk samples from 65 healthy donors in the Human Milk Bank of La Fe (Valencia, Spain).

**Results:** Lyophilization and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  significantly reduced the content of mesophilic aerobic microorganisms and *Staphylococcus epidermidis* when compared with storage at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Bactericidal activity was not significantly modified by lyophilization when compared with freezing at either  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bactericidal activity was not correlated with fat, protein, or lactose content, but was significantly correlated to ganglioside content. The bactericidal activity was significantly greater ( $P < 0.05$ ) in mature milk and in milk from women with term delivery than in milk from early lactation (days 1–7 postpartum) and milk from women with preterm delivery, respectively.

**Conclusions:** Lyophilization and storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  of human milk yields similar results and are superior to storage at  $-20^{\circ}\text{C}$  with regard to microbial and bactericidal capacities, being a feasible alternative for human milk banks.

**Key Words:** bactericidal activity, breast-feeding, human milk, human milk bank, lyophilization

(JPGN 2015;60: 527–532)

### What Is Known

- Present conditions for storing human milk include freezing at  $-20^{\circ}\text{C}/-80^{\circ}\text{C}$ , modifying its defensive properties and microbial content depending on time–storage conditions.
- Bactericidal capacity of human milk is considered as one of the most important defensive properties, remaining unknown factors controlling.
- Scarce studies have evaluated human milk lyophilization as storage alternative, founding none assessing its effects on nutritional or functional properties.

### What Is New

- Human milk lyophilization does not modify its nutritional properties, bactericidal activity, or microbiological properties.
- Bactericidal capacity of human milk depends on the gestational age and time postpartum, and is related to total ganglioside content.

**B**reast-feeding is the best exclusive feeding option for infants during the first 6 months of life. Different authorities such as the World Health Organization, the American Academy of Pediatrics, and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition recommend pasteurized donor breast milk supplied by milk banks as the best alternative when direct breast-feeding is not possible (1). In effect, donor milk affords additional benefits for premature or low-birth-weight infants in addition to its nutritional characteristics, such as protection against necrotizing enterocolitis (lessened incidence of necrotizing enterocolitis), infections, and improved food tolerance (2–4). The bactericidal capacity and microbiota of human milk are 2 properties that contribute to a specific intestinal colonization (5).

The retention of these properties in milk that has been pasteurized or stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  has been established (6–8), although the effects of other storage methods such as lyophilization (also known as freeze drying) or freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  have not been explored to date.

Human milk banks (HMBs) are increasingly common throughout the world (9), and standards based on the guidelines published by different national HMBs have been adopted—although

Received April 8, 2014; accepted November 15, 2014.

From the \*Biomedical Sciences Research Institute, University Cardenal Herrera-CEU, the †Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, the ‡Department of Animal Production and Food Science & Technology, Faculty of Veterinary, University Cardenal Herrera-CEU, and the §Pharmacy Department, Biomedical Sciences Research Institute, University Cardenal Herrera-CEU, Valencia, Spain.

Address correspondence and reprint requests to Jaime Salcedo, Department of Pharmacy, University CEU-Cardenal Herrera, Avda. Seminario s/n, 46113, Moncada, Valencia, Spain (e-mail: jsalcedodominguez@gmail.com).

The authors received financial support for the research, authorship, and/or publication of this article by Santander Bank and CEU-UCH University (BC/ICB-Santander 13/12 and PRCEU-UCH 38/11).

The authors report no conflicts of interest.

Copyright © 2015 by European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition and North American Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition

DOI: 10.1097/MPG.0000000000000641

there may be some variations in the processing criteria applied in each case. From the time of expression of the donor milk to consumption, the storage conditions used aim to maximally preserve all of the product's properties and avoid the risk of contamination.

The most common storage method is freezing, and in this regard, some of the properties of milk are modified to 1 degree or other, depending on the temperature and duration of storage (10–14).

Lyophilization is highly valued as a storage technique for complex products that require quality guarantees such as drugs, microbial strains, biological tissues, and certain foods. In this context, lyophilization offers maximum preservation of the properties of the original product. The use of lyophilization for storing human milk may be a good alternative to freezing in HMBs, allowing prolongation of the shelf life of the milk and lowering the cost of storage.

Although many studies have evaluated the stability of cold-stored (refrigerated or frozen) milk, few have examined the effects of lyophilization upon human milk, and the existing publications are moreover old and largely limited to effects upon the fat globule (15) or certain protective actions (16). The effects of lyophilization upon the nutritional value, bioactive compound stability, sensory characteristics, and microbiological properties of human milk have not been established.

Our hypothesis is that lyophilization is a suitable alternative to freeze storage at  $-80^{\circ}\text{C}$  and  $-20^{\circ}\text{C}$ , and does not increase harmful microbial content or decrease its nutritional and bioactive functionality. Moreover, this study examines the possible effect of gestational length, time postpartum, and the contents of certain nutrients and bioactive compounds (sialic acid and gangliosides) upon the bactericidal capacity of milk.

## METHODS

### Subjects and Samples

A total of 125 human milk samples from 65 healthy donors in the HMB of La Fe Hospital (Valencia, Spain) were analyzed. All of the donors gave written informed consent to use the donated milk for research purposes. As part of the routine protocol of the HMB, a full clinical history was compiled in each case, including the characteristics of the donated samples. The study was approved by the hospital ethics committee. Milk was collected at home in sterile polypropylene containers using a breast pump (Lactina, Medela, Switzerland) and was immediately frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  until transfer to the HMB, where the milk was stored under the same conditions until shipment to the laboratory of CEU-UCH University

(Valencia, Spain). Frozen storage conditions were maintained at all times.

Of the 125 total samples collected, 50 were used to study the effect of lyophilization upon the microbiological and nutritional properties: 20 samples for microbiological counts (5 mL) and 30 for the study of bactericidal capacity (2 mL) and the analysis of proteins, lipids, and lactose (3 mL).

The effect of time postpartum and gestational length upon the bactericidal capacity of the milk was analyzed using 75 samples: 20 samples corresponded to the early lactation period (collected in the first 7 days after delivery) and 37 to mature milk (collected between 15 and 125 days after delivery). In turn, 27 of the samples came from women with gestations between 26 and 36 weeks (preterm), and 25 were donated by women with gestations between 38 and 41 weeks (term).

The relation between bactericidal capacity and ganglioside and sialic acid content was evaluated in 15 milk samples with sufficient volume (40 mL) to perform 3 determinations for each sample. Figure 1 summarizes the use of samples in the course of the study.

At the time of processing, each sample was thawed and divided into 3 aliquots of 10 mL each: first aliquot (A) was destined for immediate analysis after thawing in the refrigerator at  $6^{\circ}\text{C}$  to  $-8^{\circ}\text{C}$ ; a second aliquot (B) was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ ; and a third aliquot (C) was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ , followed by lyophilization. After a period of 10 to 14 days, aliquot B was thawed at room temperature, whereas lyophilized aliquot C was reconstituted to original weight with bidistilled water. Immediate analysis of the corresponding parameters was carried out in all cases.

### Lyophilization

Sample lyophilization was carried out following the instructions of the equipment (Telstar Cryodos, Mannheim, Germany), under conditions of  $-40^{\circ}\text{C}$  and 12 mbar. Briefly, 10 mL of sample was frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  in sterile plastic tubes, and the equipment was turned on. Once the system reached working conditions ( $-80^{\circ}\text{C}$ , 0.01 mbar) and the samples were totally frozen, the samples were taken from the freezer, covered with loose parafilm, and introduced into the system. The samples were dry after 2 to 3 days.

### Microbiological Count

For microbiological analysis, 1 mL of each sample was diluted with 9 mL of 0.1% wt/vol sterile peptone water (Oxoid; Unipath Ltd, Basingstoke, UK). To estimate microbial counts,

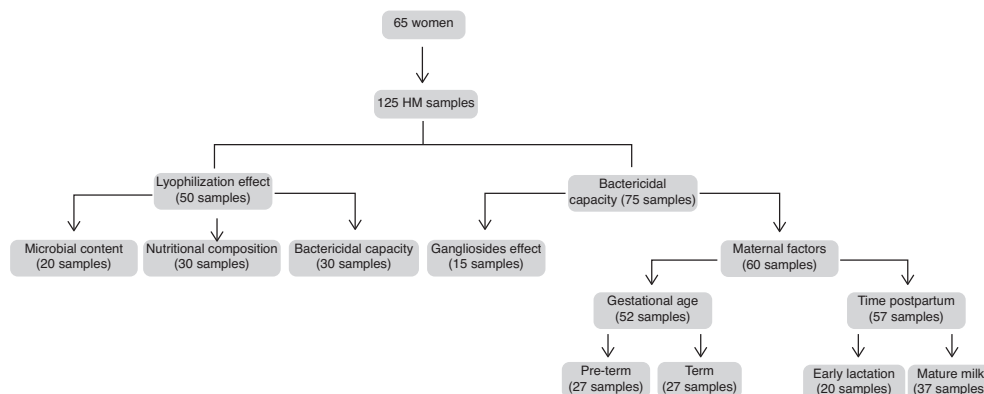


FIGURE 1. Flowchart summarizing the use of samples in the course of the study. HM = human milk.



appropriate dilutions of sample homogenates were prepared and inoculated in duplicate into growth media.

Mesophilic aerobic counts were determined by incubating plate count agar (Oxoid) at 31°C for 72 hours. *Staphylococcus aureus* was determined on Baird Parker Agar (Oxoid) with 10% (vol/vol) of Egg Yolk Tellurite Supplement by incubating the samples at 37°C for 24 hours. *Enterococci* were grown on Slanetz-Bartley (Oxoid) medium incubated at 37°C for 48 hours. Finally, *Staphylococcus epidermidis* was determined on Mannitol Salt Agar (Oxoid) incubated at 30°C for 48 hours. The results were expressed as colony-forming units per milliliter.

### Determination of Bactericidal Capacity

The bactericidal effect against *Escherichia coli* NCTC 9111 serovar O111:K58 (B4):H– was assessed using the method described by Silvestre et al (6). The degree of bacteriolysis was calculated as the difference between *E coli* counts in the control and milk samples, expressed as a percentage of the control sample counts.

### Autoanalyzer Nutrient Determination

Fat, protein, and lactose determinations were carried out using a human milk analyzer (Miris, Sweden). Briefly, samples were warmed at 37°C and homogenized with an ultrasonic homogenizer (VCX 130; Sonics & Material, Newtown, CT) for 30 seconds, and 2 mL were injected into the analyzer. Results were expressed as grams per 100 mL of milk. Before analysis, a daily calibration check was performed using the calibration solution (MIRIS check), which was provided by the supplier.

### Determination of Gangliosides and Sialic Acid

Sialic acid content, expressed as Neu5Ac, was determined by spectrophotometry according to Salcedo et al (17). Briefly, samples were hydrolyzed with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and purified with ion exchange chromatography. Neu5Ac content was determined by spectrophotometry following the resorcinol procedure of Svennerholm (18).

For the determination of gangliosides, lipid extraction was carried out following the methodology described by Puente et al (18). Once the lipid extract was obtained, the total ganglioside contents were determined as lipid-bound sialic acid using the resorcinol procedure of Svennerholm (18), whereas ganglioside identification was performed by high-performance thin-layer chromatography as previously described (19).

### Statistical Analysis

The normal distribution of the data was evaluated using the Kolmogorov-Smirnov test. Parametric statistics were used in the

event of  $P > 0.05$ , applying 1-factor analysis of variance (ANOVA) for the effect of storage methodology upon microbial content, or multifactorial ANOVA to evaluate the effects of storage method, gestational age, and time postpartum upon bactericidal capacity. In all cases, a later application of the Tukey test was used to check differences between groups. Moreover, multiple linear regression analysis was performed to explore the relation between different parameters (bactericidal capacity with nutritional composition (fat, protein, lactose), bactericidal capacity with ganglioside (total or individual) and sialic acid content). In the case of populations with a nonnormal distribution ( $P < 0.05$ ), we used the nonparametric Kruskal-Wallis test to analyze differences between groups.

## RESULTS

### Effect of Storage Method Upon Microbiological Counts

Table 1 shows the results obtained in the microbiological analyses of mesophilic aerobic microorganisms, *S aureus*, *S epidermidis*, and *Enterococcus* spp, in the samples frozen at –20°C, samples frozen at –80°C, and samples frozen at –80°C with subsequent lyophilization.

The Kruskal-Wallis test used to assess the effect of the storage method upon the counts of each of the microbial species indicated that freezing at –80°C and lyophilization resulted in significant changes ( $P < 0.05$ ) in the counts of mesophilic aerobic microorganisms and *S epidermidis*. Specifically, lyophilization significantly lowered the counts of both groups of organisms, whereas freezing at –80°C only affected *S epidermidis*, with a drop in count versus baseline. Neither *S aureus* nor *Enterococcus* spp showed significant differences in counts in either the lyophilized samples or the samples frozen at –80°C when compared with the corresponding counts in samples stored at –20°C.

### Effect of Storage Method Upon the Bactericidal Capacity of Milk

All of the analyzed samples exhibited bactericidal capacity. Table 2 shows the bactericidal capacity of the samples frozen at –20°C and of those stored at –80°C, both with and without subsequent lyophilization. A normal distribution was confirmed in all of the cases.

Multifactorial ANOVA used to investigate whether the nature of the milk samples or the method used to store the milk influenced the bactericidal capacity revealed no significant differences ( $P > 0.05$ ) attributable to either the donors or the storage method used. Lyophilization of the milk produced no significant losses in bactericidal capacity.

TABLE 1. Effect of the storage method upon microbiological counts

	Frozen at –20°C		Frozen at –80°C		Lyophilization	
	Microbial count	%	Microbial count	%	Microbial count	%
Mesophilic aerobic microorganisms	29690 ± 9830* (90–4,100,000)	85	24065 ± 2500* <sup>#</sup> (270–101,000)	100	15107 ± 2810 <sup>#</sup> (1740–24,000)	95
<i>S aureus</i>	1171 ± 1010* (200–3200)	70	2950 ± 730* (100–13,000)	60	611 ± 90* (14–2300)	70
<i>S epidermidis</i>	14443 ± 1290* (2410–47,000)	80	7057 ± 480* <sup>#</sup> (260–24,300)	85	5154 ± 310 (760–16,700)	70
<i>Enterococcus</i> spp	99202 ± 6090 (280–202,000)	20	807 ± 60 (200–1460)	20	488 ± 70 (300–620)	25

Bactericidal count and % of positive presence of mesophilic aerobic microorganisms, *S aureus*, *S epidermidis*, and *Enterococcus* spp after samples stored at –20°C, –80°C, or subjected to lyophilization. Results expressed as mean ± relative standard deviation ( $n = 20 \times 3$ ) CFU/mL. CFU = colony-forming unit.

\* Indicates not normal distribution.

<sup>#</sup> Indicate statistical differences ( $P < 0.05$ ) with values obtained in samples frozen at –20°C.

TABLE 2. Effect of the storage method upon the bactericidal capacity of human milk

	Mean $\pm$ SD	Bactericidal range effect
Freezing $-20^{\circ}\text{C}$	63.60 $\pm$ 13.75	38.24–91.62
Freezing $-80^{\circ}\text{C}$	69.15 $\pm$ 21.13	32.06–98.57
Lyophilization	63.09 $\pm$ 21.61	21.88–94.85

Bactericidal capacity of samples frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ , or subjected to lyophilization, expressed as *E coli* growing reduction (% *E coli* inhibition). Results expressed as mean  $\pm$  relative standard deviation (n = 20) of *E coli* inhibition (%) with respect to control. SD = standard deviation.

### Effect of Maternal Factors (Gestational Age and Time Postpartum) Upon the Bactericidal Capacity of Milk

An analysis was made of the possible relation between the properties of the milk (time postpartum and gestational age) and its bactericidal effect. Table 3 reports the bactericidal capacity corresponding to the early lactation period and mature milk, and for milk from women with preterm and term deliveries. A normal distribution was confirmed in all cases.

Significant differences ( $P < 0.05$ ) were recorded for both time postpartum and gestational age. In effect, the samples of mature milk had greater bactericidal capacity than colostrum, and samples from women with term delivery exhibited greater bactericidal capacity than the samples from women with preterm delivery.

### Relation Between Bactericidal Capacity and Nutritional Composition of Milk

The relation between the bactericidal capacity of milk and its lipid, protein, and lactose contents was analyzed in 30 samples. The average bactericidal capacity of these samples, expressed as the percentage inhibition of *E coli* growth, was 63.60%  $\pm$  13.75%. This value falls within the range obtained when bactericidal activity is evaluated depending maternal factors). The mean concentrations (in g/100 mL) of fat, protein, and lactose in the samples were 3.45  $\pm$  1.80, 1.07  $\pm$  0.54, and 6.90  $\pm$  0.39, respectively.

Multiple regression analysis using the bactericidal capacity of the samples as dependent variable and the concentration of the 3 macronutrients mentioned (fat, protein, and lactose) as independent variables revealed no significant relation for any of them ( $P > 0.05$ ), that is, the bactericidal capacity of the milk was not related to its fat, protein, or lactose contents.

TABLE 3. Relation between maternal factors and bactericidal capacity of human milk

	Mean $\pm$ SD	n	Bactericidal range effect
Early lactation milk	66.90 $\pm$ 15.19*	20	44.12–88.71
Mature milk	75.38 $\pm$ 11.94	37	52.28–96.57
PT delivery	64.39 $\pm$ 15.61†	27	37.50–92.81
AT delivery	73.43 $\pm$ 12.90	25	47.31–90.90

Bactericidal capacity expressed as *E coli* reduction (% inhibition). Results expressed as mean  $\pm$  relative standard deviation triplicates of each sample of *E coli* growing reduction compared with control. AT = term; PT = preterm; SD = standard deviation.

\* Indicates statistical differences ( $P < 0.05$ ) with respect to mature milk.

† Indicates statistical differences ( $P < 0.05$ ) with respect to PT values.

### Relation Between Bactericidal Capacity and Ganglioside and Sialic Acid Contents of Milk

The study of the relation between bactericidal capacity and functional components was carried out in 15 samples. Their mean bactericidal capacity (expressed as the percentage inhibition of *E coli* growth) was 70.83%  $\pm$  25.08%. The mean concentration of sialic acid and total gangliosides was 230.00  $\pm$  22.10 mg/L and 550.80  $\pm$  160.00  $\mu\text{g/L}$ , respectively.

Multiple regression analysis of the relation between the bactericidal capacity of milk and its total ganglioside and sialic acid contents revealed a strongly significant correlation ( $P = 0.0000$ ). Figure 2 shows the line adjusted to the model, with a correlation coefficient of  $r^2 = 0.8475$ .

### DISCUSSION

Human milk is not sterile. The use of culture-independent methods has allowed to identify and classify specifically bacteria present in human milk, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella*, and *Leuconostoc* being the most common of the different microorganisms identified (20,21). A recent review has pointed out the beneficial roles of human milk microbiota in infant health: it favors maturation of the infant immune system, and contributes to reduction of incidence and severity of infections and possible promotion of a “healthy” microbiome in the infant gut (22). Some microorganisms present in milk can, however, also cause illness under certain conditions, such as *Clostridium* or *Staphylococcus*, among others (23,24). The main concern of HMB is to ensure the safety of human milk, trying thus to eliminate HMB, not considering the possible lost of bacteria exerting positive effects for the body.

The effects of different freezing conditions upon the microbiological quality of human milk are known (25–28), although to our knowledge there have been no previous evaluations of the global effect of the successive freezing steps. Likewise, we know of no previous studies on the effects of lyophilization as milk storage method in HMBs. In the present study we compared the effect of lyophilization with that of present human milk storage methods ( $-20^{\circ}\text{C}$ ,  $-80^{\circ}\text{C}$ ) in terms of pathogenic bacterial abundance, the latter being a key concern in HMBs.

Mesophilic aerobic microorganisms and *Staphylococcus* (*S epidermidis* and *S aureus*) were the most frequently identified microorganisms, whereas the genus *Enterococcus* was isolated in only 20% of the samples analyzed. *Staphylococcus* and *Streptococcus* have been described as the predominant genera in fresh milk, and their counts do not vary when the product is frozen at

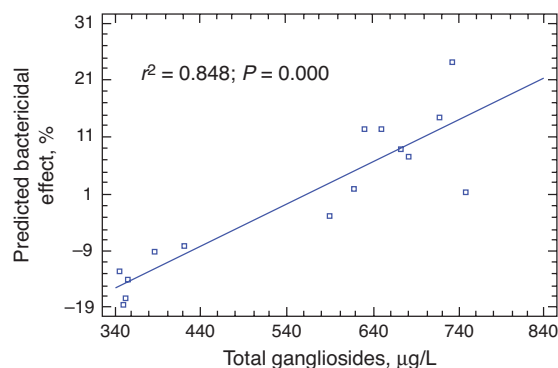


FIGURE 2. Linear relation between total ganglioside content ( $\mu\text{g/L}$ ) and bactericidal capacity (% inhibition).

–20°C for a period of 3 days to 6 months (29). This suggests that the freezing of our reference samples at –20°C should not have altered the abundance of these genera.

Subsequent sample storage at –80°C or in lyophilized (freeze-dried) form resulted in a decrease in *S epidermidis* counts in both cases. The number of mesophilic aerobic microorganisms was not modified by freezing at –80°C, but was decreased significantly in the lyophilized samples when compared with both the reference values and the samples frozen at –80°C. Neither *S aureus* nor *Enterococcus* showed significant differences after lyophilization or after freezing at –80°C. From a microbiological perspective, the results obtained define lyophilization as being as good an alternative for storing milk in the HMBs as freeze storage at –80°C because it does not increase the microbial burden of the product.

### Stability of Bactericidal Capacity

The results obtained corroborate the bactericidal activity of human milk against *E coli*, as already evidenced by previous studies (6,30). In our study, the mean bactericidal capacity of the nonstored samples (expressed as percentage inhibition of microbial growth) was lower than the capacity reported for fresh milk in previous studies (6,30,31).

The differences between our results and those found in the literature can be explained by possible milk bioactive compound loss during freezing (13,30,32).

Milk samples in our study were kept frozen at –20°C between 1 and 6 weeks before first analysis, consistent with routine practices in the HMB, and were seen to retain bactericidal capacity—although to a lesser degree than in freshly collected breast milk. These data confirm the existence of bactericidal properties in milk stored in the HMB, despite the decrease in relation to fresh milk attributed to storage of the product in the home of the donors.

We have found no studies on the additive effects of successive treatments such as those commonly used in milk banks, initial freezing in the home (–20°C), followed by storage at either –20°C or –80°C. Likewise, we have found no studies in the literature comparing the effects of lyophilization and freezing on milk in HMBs.

Our results confirm the existence of bactericidal capacity in all the milk samples, with values that differ widely among donors. The *E coli* growth-inhibiting capacity remained stable regardless of the storage method used. Freezing at –80°C during the period of time studied did not affect this capacity, and lyophilization of the milk likewise produced no changes when compared with either freezing at –80°C or the reference values.

### Factors Influencing the Characteristics of Milk

Variability is characteristic of human milk because its components and properties are influenced by a broad range of factors. In-depth studies have been performed of the effect of the time postpartum upon its nutrient contents, although the variations in biocomponents and properties are not always known. In our study, we found both time postpartum and gestational age to exert a significant influence upon the bactericidal capacity of milk. Specifically, the bactericidal properties were less apparent in the first week of lactation and increased in mature milk. This finding is surprising because one of the most valued characteristics of colostrum is its contribution to the defenses of the newborn infant. Some authors have already analyzed this effect, and the results are not always consistent. Bertino et al (12) observed no differences in the bactericidal capacity of human milk against *E coli* during the first 15 days of nursing, whereas Ogundele (30) reported a marked decrease

in bactericidal activity during the period from colostrum to transitional milk. Other studies have analyzed the changes in certain components that contribute to the global effect with the observation of different trends (33–36).

The results confirm that the antibacterial capacity of milk against *E coli* is less pronounced in milk from women with preterm infants than in those with infants born at term. We have found no studies in the literature with which to establish comparisons in this respect, although some authors have examined the effect that pregnancy may have upon certain concrete components such as proteins, lipids, enzymes, or  $\alpha$ -tocopherol (37,38). No studies have examined the overall effect, however.

Some of the bioactive components of human milk have been identified. Their chemical nature varies and includes lipids, proteins, and oligosaccharides, which are potentially active in protecting the newborn infant from infections (30). The direct relation between each of these components and the global antibacterial protection afforded by breast milk, however, remains unclear.

To examine this relation, we analyzed the concentration of macronutrients in the samples. The results revealed no significant relation between the bactericidal capacity of milk and its protein, total fat, or lactose contents. The recorded values of these nutrients were consistent with the data found in the literature, and showed important variability among samples, possibly as a consequence of the heterogeneity of the latter.

Gangliosides and sialic acid derivatives are active compounds found in human milk that intervene in many biological processes and in the development and maturation of the immune system (39–42). The concentrations of the different ganglioside and sialic acid species in human milk vary greatly among different milk samples, and the factors underlying such variability have not been clearly established (43–46). The mechanisms of action of these compounds suggest that they may contribute to the antibacterial capacity of milk.

Regression analysis showed bactericidal effects to be directly correlated to the total amount of gangliosides present in human milk ( $P = 0.039$ ,  $r = 0.896$ )—no individual ganglioside being shown to significantly contribute to this effect. To our knowledge, no studies have analyzed the relation between the bactericidal effect of human milk and the composition of the ganglioside fraction. As a result, it is not possible to compare our results with those of other authors. The bactericidal effect of bovine milk sphingolipids, which share part of the structure of gangliosides, has, however, been investigated. Sprong et al (47) observed an inhibitory effect (on bacterial growth?) of sphingolipids present in bovine milk, suggesting that gangliosides are involved in the bactericidal action observed with this fraction. Fatty acids forming part of the ganglioside ceramide moiety may confer their bactericidal activity, as has been observed in vitro (48), the sugar chain not being involved in this effect. The mentioned fatty acids may in fact be the active components of the lipid fraction described by Ogundele (30).

### CONCLUSIONS

The present work has demonstrated that lyophilization can be considered as a promising alternative for storing human milk in HMBs instead of freezing. Lyophilization does not increase harmful microbial content, decrease bactericidal capacity, or modify the nutritional value of human milk. Lyophilization, however, possibly may have negative aspects (eg, inducing a decrease in known beneficial bacteria content), hence emphasizing on the need of future studies using more comprehensive methods (likely culture-independent) to evaluate the effect of these preservation techniques on a wider range of bacterial taxa. This work also demonstrates that

the bactericidal capacity of human milk depends on the gestational age and time postpartum, and is related to total ganglioside content.

**Acknowledgments:** The authors thank A. Ramon and R. Sirvent for their kind help in collecting the samples.

## REFERENCES

- Programmes and Projects: maternal, newborn, child and adolescence health. WHO Web site. [http://www.who.int/maternal\\_child\\_adolescent](http://www.who.int/maternal_child_adolescent). Accessed December 21, 2013.
- Menon G, Williams TC. Human milk for preterm infants: why, what, when and how? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2013;98:F559–62.
- Gregory KE, Walker WA. Immunologic factors in human milk and disease prevention in the preterm infant. *Curr Pediatr Rep* 2013;1:77–82.
- Arslanoglu S, Corpeleijn W, Moro G, et al. Donor human milk for preterm infants: current evidence and research directions. ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;57:535–42.
- Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab* 2013;63 (suppl 2):8–15.
- Silvestre D, López MC, March L, et al. Bactericidal activity of human milk: stability during storage. *Br J Biomed Sci* 2006;63:59–62.
- Silvestre D, Ruiz P, Martínez-Costa C, et al. Effect of pasteurization on the bactericidal capacity of human milk. *J Hum Lact* 2008;24:371–6.
- Takci S, Gulmez D, Yigit S, et al. Container type and bactericidal activity of human milk during refrigerated storage. *J Hum Lact* 2013;29:406–11.
- <http://www.europeanmilkbanking.com/>. Accessed January 28, 2014.
- García-Lara NR, Vieco DE, De la Cruz-Bértolo J, et al. Effect of holder pasteurization and frozen storage on macronutrients and energy content of breast milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;57:377–82.
- Chang JC, Chen CH, Fang LJ, et al. Influence of prolonged storage process, pasteurization, and heat treatment on biologically-active human milk proteins. *Pediatr Neonatol* 2013;54:360–6.
- Bertino E, Giribaldi M, Baro C, et al. Effect of prolonged refrigeration on the lipid profile, lipase activity, and oxidative status of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013;56:390–6.
- Takci S, Gulmez D, Yigit S, et al. Effects of freezing on the bactericidal activity of human milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012;55:146–9.
- Miranda M, Gormaz M, Romero FJ, et al. Stability of the antioxidant capacity and pH of human milk refrigerated for 72 hours: longitudinal study. *Nutr Hosp* 2011;26:722–8.
- Dhar J, Davidson AGF, Martinez FE, et al. Ultrasonication, lyophilization, freezing and storage effects on fat loss during mechanical infusion of expressed human milk. *J Food Sci* 1995;60:375–94.
- Braga LPM, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr Brazil* 2007;83:59–63.
- Salcedo J, Lacomba R, Alegría A, et al. Comparison of spectrophotometric and HPLC methods for determining sialic acid in infant formulas. *Food Chem* 2011;127:1905–10.
- Svennerholm L. Quantitative estimation of sialic acids. II. A colorimetric resorcinol-hydrochloric acid method. *Biochim Biophys Acta* 1957;24:604–11.
- Puente R, Garcia-Pardo L-A, Hueso P. Gangliosides in bovine milk. Changes in content and distribution of individual ganglioside levels during lactation. *Bio Chem Hoppe Seyler* 1992;373:283–8.
- Collado MC, Delgado S, Maldonado A, et al. Assessment of the bacterial diversity of breast milk of healthy women by quantitative real-time PCR. *Lett Appl Microbiol* 2009;48:523–8.
- Jeurink PV, Van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microb* 2013;1:17–30.
- Fernández L, Langa S, Martín V, et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013;69:1–10.
- Quigley L, O'Sullivan O, Stanton C, et al. The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 2013;37:664–98.
- Filleron A, Lombard F, Jacquot A, et al. Group B streptococci in milk and late neonatal infections: an analysis of cases in the literature. *Arch Dis Child Fetal Neonatal E* 2014;99:F41–7.
- National Institute for Health and Clinical Excellence. Donor Breast Milk Banks: The Operation of Donor Milk Bank Services. NICE Clinical Guideline 93. National Institute for Health and Clinical Excellence; 2013.
- Pardou A, Serruys E, Mascart-Lemone F, et al. Human milk banking: influence of storage processes and of bacterial contamination on some milk constituents. *Biol Neonate* 1994;65:302–9.
- Igumbor EO, Mukura RD, Makandiramba B, et al. Storage of breast milk: effect of temperature and storage duration on microbial growth. *Cent Afr J Med* 2000;46:247–51.
- Maschmann J, Hamprecht K, Weissbrich B, et al. Freeze-thawing of breast milk does not prevent cytomegalovirus transmission to a preterm infant. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2006;91:F288–90.
- Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, et al. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009;49:343–8.
- Ogundele MO. Effects of storage on the physicochemical and antibacterial properties of human milk. *Br J Biomed Sci* 2002;59:205–11.
- Martínez-Costa C, Silvestre MD, López MC, et al. Effects of refrigeration on the bactericidal activity of human milk: a preliminary study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2007;45:275–7.
- Hernandez J, Lemons P, Lemons J, et al. Effect of storage processes on the bacterial growth-inhibiting activity of human breast milk. *Pediatrics* 1979;63:597–601.
- Lawrence RA. Milk banking: the influence of storage procedures and subsequent processing on immunologic components of human milk. *Adv Nutr Res* 2001;10:389–404.
- Ellis L, Picciano MF, Smith AM, et al. The impact of gestational length on human milk selenium concentration and glutathione peroxidase activity. *Pediatr Res* 1990;27:32.
- Ronayne De Ferrer PA, Baroni A, Sambucetti ME, et al. Lactoferrin levels in term and preterm milk. *J Am Coll Nutr* 2000;19:370–3.
- Ballabio C, Bertino E, Coscia A, et al. Immunoglobulin-A profile in breast milk from mothers delivering full term and preterm infants. *Int J Immunopath Pharm* 2007;20:119–28.
- Zachariassen G, Fenger-Gron J, Hviid MV, et al. The content of macronutrients in milk from mothers of very preterm infants is highly variable. *Dan Med J* 2013;60:A4631.
- Zheng MC, Zhang GF, Zhou LS, et al. Alpha-tocopherol concentrations in human milk from mothers of preterm and full-term infants in China. *Biomed Env Sci* 1993;6:259–64.
- Ryan JM, Rice GE, Mitchell MD. The role of gangliosides in brain development and the potential benefits of perinatal supplementation. *Nutr Res* 2013;33:877–87.
- Rueda R. The role of dietary gangliosides on immunity and the prevention of infection. *Br J Nutr* 2007;98:S68–73.
- Varki NM, Varki A. Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Inv* 2007;87:851–7.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Morrow AL. Human milk glycans protect infants against enteric pathogens. *Ann Rev Nutr* 2005;25:37–58.
- Carlson SE. N-Acetylneuraminic acid concentrations in human-milk oligosaccharides and glycoproteins during lactation. *Am J Clin Nutr* 1985;41:720–6.
- Martín-Sosa S, Martín MJ, García-Pardo R, et al. Distribution of sialic acids in the milk of Spanish mothers of full term infants during lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;39:499–503.
- Neeser JR, Golliard M, Del Vedovo S. Quantitative determination of complex carbohydrates in bovine milk and in milk-based infant formulas. *J Dairy Sci* 1991;74:2860–71.
- Wang B, Brand-Miller J, McVeagh P, et al. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas. *Am J Clin Nutr* 2001;74:510–5.
- Sprong RC, Hulstein MFE, Van der Meer R. Bovine milk fat components inhibit foodborne pathogens. *Int Dairy J* 2002;12:209–15.
- Sprong RC, Hulstein MF, Van der Meer R. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:1298–301.

## Review Article

# Role of human milk in oxidative stress associated with prematurity

María Gormaz<sup>a,b</sup>, Isabel Torres-Cuevas<sup>b</sup>, María Cernada<sup>b</sup>, Julia Kuligowski<sup>b</sup>, Elena Cubells<sup>b</sup>, Javier Escobar<sup>b</sup> and Máximo Vento<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup>*Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Valencia, Spain*

<sup>b</sup>*Neonatal Research Group, Health Research Institute La Fe, Valencia, Spain*

Received 1 January 2013

Revised 1 April 2013

Accepted 11 May 2013

**Abstract.** Fetal to neonatal transition poses a relevant threat to the newly born infant. In few minutes oxygen delivery to tissue will rise abruptly. In addition, very often aggressive therapies which include the use of oxygen are going to be necessary to assure survival of the neonate. Interestingly, the antioxidant defense system maturation pattern is not complete until the end of gestation and, therefore, preterm babies are endowed with an immature and less effective antioxidant armamentarium. Under these circumstances preterm infants are prone to oxidative stress derived serious conditions such as retinopathy of prematurity, bronchopulmonary dysplasia or intra-periventricular hemorrhage. Remarkably, human milk even in preterm mothers provides with a vast array of antioxidant substances that will undoubtedly help the infant to confront with a pro-oxidant milieu. These antioxidant properties render human milk essential for the survival of preterm infants and its use should be therefore strongly reinforced.

Keywords: Human milk, prematurity, oxidative stress, antioxidant, lactation, nutrition

## 1. Antioxidant defenses in utero

Oxygen is essential for the growth and development of multi-cellular organisms. Under physiological conditions the human fetus is relatively hypoxic compared to the adult. Thus, while the arterial partial pressure of oxygen ( $p_aO_2$ ) in an adult subject is ~12 kPa (90 mmHg), fetal  $p_aO_2$  never surpasses 4 kPa (30 mmHg) [1]. The low partial pressure of oxygen in the tissue acting as a morphogen determines the differentiation pattern of cells forming human tissues because the balance between the formation and removal of metabolically generated reactive oxygen

species (ROS) can elicit developmental events [2,3]. In experimental studies in rabbits it was shown that antioxidant enzymes (AOE) superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in lungs developed late in gestation. Interestingly, one of the most active antioxidant enzymes extracellular SOD increased significantly 150% in the last 15% of gestation paralleling that of alveolar surfactant both preparing fetal lung to successfully initiate air respiration [4]. It should be here noted that AOE require the concurrence of microminerals such as selenium, copper, zinc, manganese and iron for their biological activity; however, accretion of microminerals and vitamins in the fetal tissue only occurs in the last weeks of gestation. As a consequence, babies born prematurely have reduced micromineral and vitamin content and therefore a reduced antioxidant

\*Corresponding author: Maximo Vento MD PhD, Division of Neonatology, University and Polytechnic Hospital La Fe, Bulevar Sur s/n, 46026 Valencia, Spain. Tel.: +34 96 1245688; Fax: +34 96 1245746; E-mail: maximo.vento@uv.es.

enzyme response to free radicals [4]. Hence, preterm infants with lower copper or zinc status have decreased Cu-Zn SOD activity as compared to control term babies and eliminate significantly greater amounts of 8-hydroxy-2'-deoxy-guanosine (8OHdG) reflecting increased oxidative stress [5]. Selenium is an essential micronutrient associated with decreased oxidative stress through selenoproteins, being the GPx family members the most studied; notwithstanding, it also has an independent antioxidant activity linked to decreased transcription and expression of Mn-SOD and uncoupling protein 2. Furthermore, other selenoproteins are important component of the antioxidant host defense system affecting leukocyte and NK cell function. The milk globule regulating mechanisms control the synthesis and secretion of seleno-compounds throughout lactation, with a high total Se level in colostrum that decreases as lactation progresses. Selenium is present in breast milk principally as selenoproteins (especially as GPx) but also as seleno-amino acids (seleno-cystamine, seleno-cystine, seleno-methionine), and is greater in breast-fed than in formula fed [6]. Supplementation with Se to lactating rats significantly increased its content in the milk and similarly, preterm infants receiving supplements of Se exhibited significantly increased plasma levels as controls; nonetheless, preterm babies with higher Se plasma levels and GPx activity did not show reduced oxidative stress or less incidence of bronchopulmonary dysplasia and/or retinopathy of prematurity [7]. Remarkably, supplementation with Se reduced the incidence of nosocomial sepsis in extremely preterm infants and has therefore been considered a promising therapy for this population [8,9].

Vitamins A, E and C are also relevant as antioxidants for the newborn infant. Hence, they are known for inhibiting ROS-induced lipid peroxidation and scavenge ROS. Similarly as with micromineral, antioxidant vitamins A and E also accumulate in the fetus in the last trimester of pregnancy and, therefore preterm infants are endowed with low stores of vitamin A and E especially those who are formula fed [10]. Vitamin A is essential for regulation and promotion of growth and differentiation of cells in the retina and cells that line the lung. It has been shown that plasma  $\beta$  carotene and vitamin A concentrations are lower in preterm infants and especially in those who develop bronchopulmonary dysplasia [11]. Intriguingly, supplementation of vitamin A to pregnant women and or to their babies after birth has retrieved controversial

results. Hence, a recent Cochrane review informed that supplementation of vitamin A to malnourished pregnant women in developing countries did not exert a beneficial effect on mothers or babies except for a slight increase in mean birth weight [12]. Conversely, in other recent studies performed in developed and developing countries beneficial effects of vitamin A supplementation to mothers and babies consisting in improved respiratory outcome and less incidence of moderate to severe bronchopulmonary dysplasia were reported [13,14]. Notwithstanding, it should be noted that experimental research has underlined the pro-oxidant potential of retinoic acid and deleterious effects when supplemented during pregnancy and lactation. Thus, both pregnant rats supplemented with high doses of vitamin A and their offspring experienced oxidative damage in striatum and hippocampus which led to cognitive and behavioral impairment [15]. The same group studied relevant side-effects in the lung of offspring of pregnant and lactating rats supplemented with vitamin A. Analysis of the fetal and offspring lungs exhibited increased lipo-peroxidation, protein carbonyl, activities of the AOE and decreased sulphhydryl protein as unequivocal signs of oxidative damage [16]. Hence, caution should be paid regarding vitamin A supplementation during pregnancy and lactation and especially in women of developed countries with replenished vitamin A stores. Similarly, although tocopherols are known for being potent antioxidants preventing lipid peroxidation, supplements during pregnancy to avoid oxidative stress associated conditions such as preeclampsia or to preterm babies to avoid free-radical associated conditions such as bronchopulmonary dysplasia or retinopathy of prematurity have rendered inconsistent results. Hence, although some benefits have been found in the form of reduced germinal matrix/intraventricular hemorrhage, the substantial increased risk of sepsis blunts the routine supplementation with vitamin E especially to the extremely low gestational age neonates [17].

Similarly, non-enzymatic antioxidants acquire full expression and activity no later than the last weeks of gestation. Hence, glutathione (GSH) a ubiquitous tripeptide formed by  $\gamma$ -glutamine, L-cysteine and glycine, has been found at lower concentrations in erythrocytes from preterm babies as compared to term babies [18]. GSH has diverse functions such as detoxification, maintenance of thiol status, modulation of cell proliferation and antioxidant defense [19]. GSH is able to reduce free radicals by establishing a

disulfide bond with another GSH molecule forming oxidized glutathione (GSSG) and thus providing one electron. GSSG is reduced again to GSH by the action of glutathione reductase (GSH-reductase) with the electrons provided by NADPH [20]. Of relevance is the fact that the major determinants of GSH synthesis are the availability of L-cysteine, the sulfur amino acid precursor, and the activity of glutamate cysteine ligase. In this regard, the limiting enzyme for L-cysteine synthesis,  $\gamma$ -cystathionase, has been shown to be expressed late in gestation [21]. Hence, in a prospective study preterm infants < 1500 g of birth-weight were randomly assigned to receive standard (40 mg/kg/d) or high (81 mg/kg/d) L-cysteine supplementation in the first 6 days after birth. No differences in circulating cystine, glutathione content or rate of synthesis of glutathione were found between groups [22]. Remarkably, cord blood erythrocytes from preterm infants with similar weight and gestational age synthesized GSH at a significantly lower rate than term infants when incubated with precursors (methionine, glutamic acid, glycine) [18]. However, substitution of methionine with N-acetyl-cysteine in the incubating milieu therefore by-passing the limiting enzyme  $\gamma$ -cystathionase significantly increased the rate of GSH synthesis approaching that of term neonates [18]. Similarly, isolated hepatocytes of offspring of pregnant rats treated with N-acetyl-cysteine were able to increase GSH production as compared with non-treated controls [23]. The availability of L-cysteine for the synthesis of glutathione and other sulphur-disulfide compounds in humans in the first days after birth is secured by the high L-cysteine content in the whey proteins of colostrum [24–26].

Fetal development *in utero* is protected because of the indispensable role of redox signaling through uterine-fetal interactions. There is evidence for spatio-temporal regulation of AOE (particularly SOD) in the context of local nitric oxide (NO) generation via nitric oxide synthases and downstream NO-dependent signaling in the placenta, critically important for vascular development [27]. Similarly to what occurs in the fetus, studies performed in human abortus materials and from placenta obtained at term have shown that AOE activities also increased along gestation, and especially in the last trimester [28]. In conditions such as recurrent pregnancy loss, preeclampsia, preterm premature rupture of membranes, intrauterine growth restriction (IUGR) and fetal death oxidative stress has been suggested as causative agents. Hence, free radi-

cals are going to provoke a switch towards a pro-oxidant status causing negative effects on the placenta and subsequently upon fetal growth and development [29]. Markers of oxidative stress, such as non-protein bound iron, have been measured in cord blood as an indicator of intrauterine ROS production. These markers have been associated with the development of several postnatal disease processes, revealing that in utero oxidative stress is a significant risk factor, especially in preterm neonates [10].

## 2. Oxidative stress in the fetal to neonatal transition in preterm infants

In the fetal-to-neonatal transition there is an abrupt increase in oxygen availability [30], and in few minutes the  $p_aO_2$  reaches adult values [31,32]. This sudden increase in oxygenation induces the formation of oxygen and nitrogen reactive species, many of which are free radicals [33] that may act as signaling molecules modulating maturation of specific metabolic pathways [34,35]. Hence, oxidative stress is inherent to fetal to neonatal transition. Studies performed in fetal and neonatal rat pups isolated hepatocytes showed that GSH/GSSG ratio significantly decreased in neonatal as compared to fetal revealing a physiologic pro-oxidant status in the fetal to neonatal transition [36]. However, under certain circumstances fetal to neonatal transition will lead unequivocally to profound and non-physiologic oxidative stress [1,37–39]. Thus, birth asphyxia which is characterized by prolonged periods of hypoxia will cause an exhaustion of ATP and an accumulation of purine derivatives especially hypoxanthine. Under normal circumstances hypoxanthine is metabolized by xanthine reductase to uric acid. However, upon re-oxygenation with elevated concentrations of oxygen specific proteases will activate xanthine oxidase production which uses oxygen as a substrate and generates a burst of oxygen free radicals especially anion superoxide. In the presence of ferrous iron Fenton chemistry will ensue enhancing the production of hydroxyl radicals. Moreover, anion superoxide combined with NO will lead to the production of a highly reactive nitrogen species as is peroxy-nitrite [40].

In preterm infants, the burden imposed upon fetal to neonatal transition and postnatal adaptation is still greater. Prematurity disrupts antioxidant system mat-

Table 1  
Milk constituents conferring antioxidant protection. Adapted from references 46, 49, 51–54, 56–59

Micronutrient	Constituent of	Biological function
Iron (Fe)	Catalase	Prevention of hypoxia in hemoglobin/myoglobin
Manganese (Mn)	MnSOD	Dismutation of anion superoxide
Copper (Cu)	CuZnSOD	Dismutation of anion superoxide; Ceruloplasmin; Iron metabolism
Zinc (Zn)	CuZnSOD	Dismutation of anion superoxide; Methallothionein; Membrane stabilization Displacement of iron
Magnesium (Mg)	Intracellular ion	Cofactor in pentose-phosphate pathway; Reactions involving ATP Deficiency enhances ROS generation
Selenium (Se)	Glutathione Peroxidase	To reduce lipid hydroperoxides and hydrogen peroxide to alcohol and water respectively
Riboflavin	Glutathione reductase	Flavin Adenin Dinucleotide cofactor; Reduction of GSSG to GSH
Thiamine		Transketolase pentose phosphate pathway
Nicotinamide	NAD <sup>+</sup> , NADP <sup>+</sup> , NADPH, NADH	Energy metabolism; DNA repair; Poly (ADP ribose) polymerase Glutathione reductase & Catalase function
Folic acid		Minimizes plasma homocysteine level for prevention of endothelial vascular damage
Vitamin C		Free radical scavenger Recycles tocopheryl radical to tocopherol
Vitamin E		Chain breaking antioxidant protects membranes and LDL from peroxidation
Vitamin A		Free radical quenching

uration and therefore the antioxidant defenses will not be fully developed or functional [41]. In this context oxidative stress can be accrued from different sources. Hence, preterm infants especially below 32 weeks gestation will require oxygen therapy to achieve targeted saturations in the delivery room, and clinical trials have shown that the levels of different biomarkers of oxidative stress such as ortho-tyrosine, F2-isoprostanes or 8OHdG in urine directly correlate with the oxygen load received; moreover, there seems to be a correlation between elevated markers of oxidative stress in the first days after birth and later development of chronic lung disease [40,42]. Moreover, oxygen therapy associated with mechanical ventilation is needed in a significant number of preterm babies to overcome lung immaturity. Additional sources of free radicals are associated with the use of parenteral nutrition, phototherapy and/or nosocomial septicemia [43]. Clinical studies have consistently shown that increased ROS production occurs in preterm babies and is associated with an impaired activation of antioxidant enzyme concentration and activity [4]. Moreover, the adaptive capacity of preterm infants to oxidative stress associated with birth is substantially decreased as compared with term infants. Hence, studies comparing ROS production and umbilical vein and umbilical artery total radical trapping antioxidant potential and glutathione between term and preterm infants showed an increased consumption of antioxidants in preterm infants as well as a reduction in the

antioxidant reserve rendering these babies susceptible to pro-oxidant aggression [43–45].

### 3. Antioxidant capacity of human milk (HM)

Milk antioxidant composition is extraordinarily complex functioning by different chemical reactions, which collectively culminate in a stable food source for the breastfed infant [46]. Hence, especially fatty acid composition would prevent lipid peroxidation and rancidity. In addition, specific antioxidant components could directly scavenge free radicals thus avoiding oxidative stress. Finally, certain peptides could elicit a response through genomic activation of the antioxidant system in the intestinal epithelial cells meant to protect intestinal epithelium against free radical aggression [47].

Since up-regulation of antioxidants does not occur in preterm babies HM could directly scavenge free radicals and contribute to decrease free radical associated conditions [48]. The complete list of antioxidants present in HM is still unknown (Table 1) but the most widely detected exogenous antioxidants are microminerals (Zn, Cu, Se, Mn), antioxidant vitamins (A, E, C,  $\beta$  carotene), fatty acids and antioxidant enzymes such as GPx, CAT, SOD, and non-enzymatic antioxidants such glutathione. Of great interest is the fact that antioxidants are in a significantly greater proportion in HM than in bovine milk [24,49].



Moreover, iron-sequestering proteins such as lactotransferrin (LTF) which are in elevated concentrations in HM have also been associated with reduced generation of iron-derived free radicals [49]. In addition to low-molecular weight antioxidants, bioactive peptides that are present in bovine milk can act as antioxidants at the intestinal level. Hence, antioxidant properties that prevent peroxidation of essential fatty acids have also been shown for peptides derived from milk proteins. The addition of a Leu or Pro residue to the N-terminus of a His-His, di-peptide will enhance antioxidant activity and facilitate further synergy with non-peptide antioxidants. Of note, tryptic digests of casein yielding caseino-phosphopeptides exhibit both hydrophilic and lipophilic antioxidant activity due to both metal ions sequestering and quenching of ROS [50]. Interestingly, peptide fraction of digested milk PF23 with tryptophan as main component has been shown to exhibit high antioxidant activity. Of note, tryptophan added to cultured intestinal epithelial cells had an intense pro-oxidant activity. However, exposure of intestinal cells to tryptophan resulted in an adaptive response consisting Nrf2 pathway activation and an increase in the transcript level of glutathione peroxidase 2. Hence, it could be speculated that peptidic components of HM could act triggering antioxidant pathways leading to intestinal protection from free radicals. This ability of HM of protecting intestinal mucosa against free radical aggression could at least partially explain its ability to protect against free radical-mediated diseases [47]. Hence, numerous clinical studies have shown that HM offers a significant protection against free radical associated conditions. In fact, compared to formula feeding cohorts, breastfeeding cohorts have been reported to show a significant decrease in the development of necrotizing enterocolitis, better neurodevelopment and a decrease in the development of retinopathy of prematurity [49]. Buescher and colleagues [51] reported that human colostrum exhibited antioxidant properties and was capable of inducing spontaneous reduction of cytochrome *c*, depletion of polymorphonuclear leukocyte-produced hydrogen peroxide, and protection of epithelial cells from polymorphonuclear leukocyte-mediated detachment. Friel and colleagues [52] showed that under pro-oxidant conditions HM spared significantly more ascorbate than did formula. Moreover, ascorbate radical production was more intense in formula than in breast milk. Finally, oxygen consumption was less in HM than in formula. Addi-

tional experiments showed that there were no differences between milk from preterm mothers as compared to that from term mothers' milk. It was concluded that milk from mothers of preterm and term infants had equal resistance to oxidative stress and provided significantly better protection than formula [52]. Other studies have confirmed the presence of enzymatic antioxidants including superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and non enzymatic antioxidants including vitamin C, E, A, and  $\beta$  carotene and a greater antioxidant capacity of HM [52–56]. In a study conducted by Shoji and colleagues [57] in cultured intestinal epithelial cells pre-incubated with breast milk, bovine milk, or formulas and treated thereafter with hydrogen to induce oxidative stress, it was observed that breast milk incubated epithelial cells maintained the highest cell survival rate (50%) compared with no pre-treatment (27%), bovine milk treatment (6%), or formula treatment (13%–16%) of cells. It was concluded that breast milk may act as an antioxidant in the gastrointestinal tract of infants [57]. Ezaki and colleagues [49] showed an increased total antioxidant capacity of preterm fed with HM as compared to formula using the biological anti-oxidant potential test. Although a negative correlation was observed between the total antioxidant capacity of preterm human milk and age, it remained always significantly higher than that of preterm formula. Biological anti-oxidant potential test is based on the ability of a colored solution containing a source of ferric ions bound to a special chromogenic substrate to discolor when ferric ions are reduced to ferrous ions as occurs by adding a reducing/antioxidant system [49]. More recently, Friel and colleagues [58] provided evidence that the fraction of HM containing tryptophan displayed an extraordinary scavenging activity. Moreover, addition of tryptophan to HM and to formula significantly increased their antioxidant properties. Yao and colleagues [59] analyzed the antioxidant capacity of HM using a combined in vitro digestion/cell culture model mimicking conditions found in the gastrointestinal system of the preterm infant. Two cell lines – Caco-2BBE and HT29-MTX – were co-cultured and intracellular oxidative stress was measured using two oxidant-sensitive dyes, and DNA oxidative damage. Results suggested that both HM and digested HM reduced oxidative stress and hydrogen peroxide induced DNA damage [59]. Tijerina-Saenz and colleagues [60] have recently studied the correlation of antioxidant capacity of HM and several of its

components using the oxygen radical absorbance capacity test modified with fluorescein to increase its sensitivity and photo-stability. Of note was the correlation between the anti-oxidant capacity of mature milk's at one month and the concentration of  $\alpha$ -tocopherol, but not with the concentration of vitamin A.

### 3.1. Human milk and antioxidant damage

Several studies have addressed the capability of HM to protect neonates and infants from oxidative damage due to biological molecules. Shoji and colleagues [61] showed that urinary elimination of 8OHdG correlated with the amount of HM received; thus, infants belonging to the group that received > 90% HM eliminated significantly lower amounts of urinary 8-OHdG than those fed > 90% formula. The same researchers obtained similar results when studying the effect of feeding HM to very low birth-weight neonates as compared to feeding formula [62]. More recently, it has been shown that preterm infants eliminated significantly higher amounts of 8OHdG and ortho-tyrosine than term infants [63]. The concentration of these biomarkers of oxidative damage to DNA and to proteins inversely correlated with gestational age. Preterm infants exclusively fed mother's milk eliminated significantly lower amounts of both biomarkers compared with babies fed formula [63]. Iron supplementation is a common practice in preterm infants given the tendency toward iron-deficiency. However, it has been shown that addition of iron significantly increases free radical generation and oxidative stress. LTF, a glycoprotein member of the iron-binding transferrin family, inhibits the formation of ROS by binding iron thus attenuating oxidation. Hence, the addition of human recombinant LTF to formula and to preterm HM decreases free radical production in patients who had received medicinal iron or fortifiers [64].

### 3.2. Antioxidant properties after milk pasteurization, storage or fortifier addition

The extraordinary value of HM in the early nutrition of preterm infants has been increasingly recognized and promoted by scientific societies [65,66]. However, a significant number of mothers of preterm infants are unable to feed or to providing an adequate milk volume to meet their infants needs. To overcome these difficulties human donor milk (HDM) is rou-

tinely employed in many neonatal units. However, HDM has to undergo thermal processing (pasteurization) to eliminate the risk of transmission of infectious agents especially cytomegalovirus, HIV, hepatitis B and others [67]. The most common employed method is the Holder method (62.5°C for 30 min). However, it has been shown that pasteurization significantly decreases bioactive factors such as immunoglobulins, bile-stimulated lipase, lysozyme, lactoferrin while others such as transforming growth factor  $\alpha$  or  $\beta$ 2 are not affected. It has been therefore suggested the use of the high-temperature-short time method which apparently preserves better bioactivity of HM components [68–70]. Only few studies have approached the thermal effect (pasteurization or refrigeration/freezing) on antioxidant properties of HM or HDM. To study the effect of heating upon HM, samples of human donors were analyzed for oxidative stress markers (GSH, GPx activity, malondialdehyde and total antioxidant capacity) after randomized assignment to two different methods of pasteurization [(Holder method (63°C for 30 min) or 75°C for 15 sec)]. Non-pasteurized HM served as control. While malondialdehyde was similar in both batches, there was a decrease in GSH concentration and total antioxidant capacity in thermally processed samples versus fresh milk samples. Of note, the use of Holder method produced a significantly greater descent in the antioxidant capacity of milk [55]. Freezing HDM is also a common practice in neonatal units especially meant to avoid bacterial contamination but also to suppress cytomegalovirus activity. Hanna and colleagues [54] studied the effect of cooling (4°C) or freezing (–20°C) on the antioxidant capacity of HDM stored for 2 to 7 days provided by mothers who had delivered prematurely or at term, and also compared it to artificial formula. Fresh samples were processed immediately. The assay used measured the ability of milk to inhibit 2,2'-azino-di-3-(ethyl-benthiazolin- sulphate) to its radical cation compared with Trolox. Results indicated that there was a direct correlation between timing and also temperature. Hence, antioxidant activity in frozen milk was lower than in refrigerated milk and both lower than in fresh milk; in addition, milk that was kept for longer time (7 days) had lesser antioxidant activity than that kept for shorter time (2 days). Silvestre and colleagues [55] compared the effect of two different freezing temperatures (–20°C vs. –80°C) and different storage times (15, 30 and 60 days) upon the antioxidant capacity of HDM. The biomarkers

employed for assessing antioxidant capacity were GPx activity and malondialdehyde concentration. Results revealed that freezing at  $-80^{\circ}\text{C}$  for 30 days or less preserved the antioxidant activity better than at  $-20^{\circ}\text{C}$ ; however, when freezing is prolonged more than 60 days GPx activity is similar independently of the temperature. Thermal treatment including heating and cooling/freezing both may affect antioxidant properties of HDM; however, high-temperature-short time pasteurization and deep freezing for 60 days both seem to achieve desired bacteriological and anti-viral effects while preserving antioxidant capacity of HDM.

Fortification of mother's milk or HDM has become a common practice in neonatology to avoid postnatal growth restriction which has been associated with poor neurocognitive development. Interestingly, pre-term human milk changes along the first weeks of lactation and especially protein content diminishes reaching concentrations of 0.9 g/dL which by far do not meet recommended requirements of 3.5 g/kg/day. Under these circumstances fortification of HM or HDM is necessary to avoid undernutrition [71]. Seemingly laudable as it is to fortify HM or HDM to approach desired postnatal growth and development, it has been very recently shown that the use of fortifiers may alter the antioxidant capacity of HM. Hence, in a very recent trial Friel and colleagues [72] evaluated oxidative stress using urinary F2-isoprostanes, and protein carbonyls and oxygen radical absorbance capacity in plasma of low birth weight infants receiving HM different amounts of fortifier and compared results with preterm babies receiving formula. Unexpectedly, they found elevated F2-isoprostanes which directly correlated with the highest concentration of fortifier. Explanation for this finding is still elusive; however, previous studies have shown different problems associated with HM fortification such as rapid spoil, abolishment of antimicrobial capacity or sequester of anti-inflammatory cytokines [72]. Preterm infants are challenged by a tendency towards protracted oxidative stress because their antioxidant capacity is limited and they have to survive in a pro-oxidant environment dealing with oxygen therapy, infections, phototherapy, parenteral nutrition etc. [4]. Preterm human milk is protective against free radical aggression [63]; however, it does not fully meet nutritional requirements to assure an adequate postnatal growth and development. Therefore preterm human milk fortification has been almost universally in-

cluded in the nutritional protocols for low birth weight infants [71]. Under these circumstances, caution should be paid when addition of fortifiers to HM or HDM is recommended and perhaps the use of non invasive monitorization of oxidative stress biomarkers should be implemented.

### Acknowledgments

This study was funded with a FIS grant PI011/0313 to M Vento, J Escobar, E Cubells and M Aguar, CD12/00667 grant to J Kuligowski, FI12/00109 grant to I Torres-Cuevas from the Instituto Carlos III (Ministry of Economy and Competitiveness; Spain) and Health Research Institute Research Grant to M Cernada.

### Conflict of interest

None of the authors of this manuscript declares having disclosures or conflicts of interest to declare.

### References

- [1] Vento M, Sastre J, Asensi MA, Viña J. Room-air resuscitation causes less damage to heart and kidney than 100% oxygen. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172(11): 1393-8.
- [2] Allen RG, Balin AK. Oxidative influence on development and differentiation: an overview of a free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 1989; 6(6): 631-61.
- [3] Hitchler MJ, Domann FE. An epigenetic perspective on the free radical theory of development. *Free Radic Biol Med* 2007; 43(7): 1023-36.
- [4] Davis JM, Auten RL. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 2010; 15(4): 191-5.
- [5] Nassi N, Ponziani V, Becatti M, Galvan P, Donzelli G. Antioxidant enzymes and related elements in term and preterm newborns. *Pediatr Int* 2009; 51(2): 183-7.
- [6] Dórea JG. Selenium and breast-feeding. *Br J Nutr* 2002; 88(5): 443-61.
- [7] Winterbourn CC, Chan T, Buss IH, Inder TE, Mogridge N, Darlow BA. Protein carbonyls and lipid peroxidation products as oxidation markers in preterm infant plasma: associations with chronic lung disease and retinopathy and effects of selenium supplementation. *Pediatr Res* 2000; 48(1): 84-90.
- [8] Darlow BA, Austin NC. Selenium supplementation to prevent short-term morbidity in preterm neonates. *Cochrane Database Review* 2003; (4): CD003312.
- [9] Tarnow-Mordi W, Isaacs D, Dutta S. Adjunctive immunologic interventions in neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 2010; 37(2): 481-99.
- [10] Lee JJ, Davis JM. Future applications of antioxidants in premature infants. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23(2): 161-6.

- [11] Ballard PL, Truog WE, Merrill JD, Gow A, Posencheg M, Golombek SG et al. Plasma biomarkers of oxidative stress: relationship to lung disease and inhaled nitric oxide therapy in premature infants. *Pediatrics* 2008; 121(3): 555-61.
- [12] van der Broek N, Dou L, Othman M, Neilson JP, Gates S, Gülmezoglu AM. Vitamin A supplementation during pregnancy for maternal and newborn outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; Nov 10(11): CD008666.
- [13] Babu TA, Sharmila V. Vitamin A supplementation in late pregnancy can decrease the incidence of bronchopulmonary dysplasia in neonates. *J Matern Fetal Neonatal Dis* 2010; 23(12): 1468-9.
- [14] Moreira A, Caskey M, Fonseca R, Malloy M, Geary C. Impact of providing vitamin A to the routine pulmonary care of extremely low birth weight infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2012; Jan 25(1): 84-8.
- [15] Schnorr CE, da Silva Morrone M, Simoes-Pires A, da Rocha RF, Behr GA, Moreira JC. Vitamin A supplementation in rats under pregnancy and nursing induces behavioral changes and oxidative stress upon striatum and hippocampus of dams and their offspring. *Brain Res* 2011; Jan 19(1369): 60-73.
- [16] Pasquali MA, Schnorr CE, Feistauer LB, Gelain DP, Moreira JC. Vitamin A supplementation to pregnant and breastfeeding female rats induces oxidative stress in the neonatal lung. *Reprod Toxicol* 2010; 30(2): 452-6.
- [17] Brion LP, Bell EF, Raghuvver TS. Vitamin E supplementation for prevention of morbidity and mortality in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2003; (3): CD003665.
- [18] Viña J, Vento M, García-Sala F, Puertes IR, Gascó E, Sastre J et al. L-cysteine and glutathione metabolism are impaired in premature infants due to cystathionase deficiency. *Am J Clin Nutr* 1995; 61(5): 1067-9.
- [19] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30(1-2): 42-59.
- [20] Markovic J, García-Jimenez JL, Gimeno A, Viña J, Pallardo FV. Role of glutathione in cell nucleus. *Free Radic Res* 2010; 44(7): 721-33.
- [21] Martín JA, Pereda J, Martínez-López I, Escrig R, Miralles V, Pallardó FV et al. Oxidative stress as a signal to up-regulate gamma-cystathionase in the fetal-to-neonatal transition in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2007; 53 Suppl: OL1010-7.
- [22] te Braake FW, Schierbeek H, Vermes A, Huijman JG, van Goudoever JB. High-dose cysteine administration does not increase synthesis of the antioxidant glutathione preterm infants. *Pediatrics* 2009; 124(5): e978-84.
- [23] Sastre J, Asensi M, Rodrigo F, Pallardo FV, Vento M, Viña J. Antioxidant administration to the mother prevents oxidative stress associated with birth in the neonatal rat. *Life Sci* 1994; 54(26): 2055-9.
- [24] L'Abbe MR, Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 months of lactation. *J Pediatr Gastr Nutr* 2000; 31(3): 270-4.
- [25] Baro C, Giribaldi M, Arslanoglu S, Guiffreda MG, Dellavalle G, Conti A et al. Effect of two pasteurization methods on protein content of human milk. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011; 3: 818-29.
- [26] Lönnerdal B. Bioactive proteins in human milk: mechanisms of action. *J Pediatr* 2010; 156(2 Suppl): S26-30.
- [27] Land SC. Oxygen-sensing pathways and the development of mammalian gas exchange. *Redox Rep* 2003; 8(6): 325-40.
- [28] Qanungo S, Mukherjee M. Ontogenic profile of some antioxidants and lipid peroxidation in human placental and fetal tissue. *Mol Cell Biochem* 2000; 215(1-2): 11-9.
- [29] Kontic-Vucinic O, Tercic M, Radunovic N. The role of antioxidant vitamins in hypertensive disorders of pregnancy. *J Perinat Med* 2008; 36(4): 282-90.
- [30] House JT, Schultetus RR, Gravenstein N. Continuous neonatal evaluation in the delivery room by pulse oximetry. *J Clin Monit* 1987; 3(2): 96-100.
- [31] Comporti M, Signorini C, Leoncini S, Buonocore G, Rossi V, Ciccoli L. Plasma F2-isoprostanes are elevated in newborns and inversely correlated to gestational age. *Free Radic Biol Med* 2004; 37(5): 724-32.
- [32] Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, García-Sala F, Viña J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr* 2003; 142(3): 240-6.
- [33] Collard KJ. Iron homeostasis in the neonate. *Pediatrics* 2009; 123(4): 1208-16.
- [34] Forman HJ, Fukuto JM, Miller T, Zhang H, Rinna A, Levy S. The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal. *Arch Biochem Biophys* 2008; 477(2): 183-95.
- [35] Martín JA, Pereda J, Martínez-López I, Escrig R, Miralles V, Pallardó FV et al. Oxidative stress as a signal to up-regulate gamma-cystathionase in the fetal-to-neonatal transition in rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2007; 53 Suppl: OL1010-7.
- [36] Pallardo FV, Sastre J, Asensi M, Rodrigo F, Estrela JM, Viña J. Physiologic changes in glutathione metabolism in foetal and newborn rat liver. *Biochem J* 1991; 274(Pt 3): 891-3.
- [37] Vento M, Asensi M, Sastre J, García-Sala F, Pallardó FV, Viña J. Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* 2001; 107(4): 642-7.
- [38] Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, García-Sala F, Miñana JB et al. Hyperoxemia caused by resuscitation with pure oxygen may alter intracellular redox status by increasing oxidized glutathione in asphyxiated newly born infants. *Semin Perinatol* 2002; 26(6): 406-10.
- [39] Vento M, Asensi M, Sastre J, Lloret A, García-Sala F, Viña J. Oxidative stress in asphyxiated term infants resuscitated with 100% oxygen. *J Pediatr* 2003; 142(3): 240-6.
- [40] Vento M, Saugstad OD. Oxygen supplementation in the delivery room: Updated information. *J Pediatr* 2011; 158(2 Suppl): e5-7.
- [41] Vento M, Cheung PY, Aguar M. The first golden minutes of the extremely-low-gestational-age neonate: a gentle approach. *Neonatology* 2009; 95(4): 286-98.
- [42] Vento M, Moro M, Escrig R, Arruza L, Villar G, Izquierdo I et al. Preterm resuscitation with low oxygen causes less oxidative stress, inflammation, and chronic lung disease. *Pediatrics* 2009; 124(3): e439-49.
- [43] Maltepe E, Saugstad OD. Oxygen in health and disease: regulation of oxygen homeostasis-clinical implications. *Pediatr Res* 2009; 65(3): 261-8.
- [44] Georgeson GD, Szony BJ, Streitman K, Varga IS, Kovács A, Kovács L et al. Antioxidant enzyme activities are decreased in preterm infants and in neonates born via caesarean section. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002; 103(2): 136-9.
- [45] Lurie S, Matas Z, Boaz M, Fux A, Golan A, Sadan O. Different degrees of fetal oxidative stress in elective and emergent cesarean section. *Neonatology* 2007; 92(2): 111-5.
- [46] Tijerina-Saenz 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): 1793-8.
- [47] Elisía I, Tsopmo A, Friel JK, Diehl-Jones W, Kitts DD. Tryptophan from human milk induces oxidative stress and upregulates the Nrf-2 mediated stress response in human intestinal cell lines. *J Nutr* 2011; 141(8): 1417-23.
- [48] Darlow BA, Austin NC. Selenium supplementation to pre-

- vent short-term morbidity in preterm neonates. *Cochrane Database Review* 2003; (4): CD003312.
- [49] Ezaki S, Ito T, Suzuki K, Tamura M. Association between total antioxidant capacity in breast milk and postnatal age in days in premature infants. *J Clin Biochem Nutr* 2008; 42(2): 133-7.
- [50] L'Abbe MR, Friel JK. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase content of human milk from mothers of premature and full-term infants during the first 3 month of lactation. *J Pediatr Gastr Nutr* 2000; 31(3): 270-4.
- [51] Raghuvver TS, McGuire EM, Martin SM, Wagner BA, Rebouché CJ, Buettner GR et al. Lactoferrin in the preterm infants' diet attenuates iron-induced oxidation products. *Pediatr Res* 2002; 52(6): 964-72.
- [52] Buescher ES, McIlheran SM. Antioxidant properties of human colostrum. *Pediatr Res* 1988; 24(1): 14-9.
- [53] Friel JK, Martin SM, Langdon M, Herzberg GR, Buettner GR. Milk from mothers of both premature and full-term infants provides better antioxidant protection than does infant formula. *Pediatr Res* 2002; 51(5): 612-8.
- [54] Aycicek A, Erel O, Kocyigit A, Selek S, Demirkol MR. Breast milk provides better antioxidant power than does formula. *Nutrition* 2006; 22(6): 616-9.
- [55] Hanna N, Ahmed K, Anwar M, Petrova A, Hiatt M, Hegyi T. Effect of storage on breast milk antioxidant activity. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89(6): F518-20.
- [56] Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for pasteurization. *Acta Paediatr* 2008; 97(8): 1070-4.
- [57] Turolí D, Testolin G, Zanini R, Bellú R. Determination of oxidative status in breast and formula milk. *Acta Paediatr* 2004; 93(12): 1569-74.
- [58] Shoji H, Oguchi S, Fujinaga S, Shinohara K, Kaneko K, Shimizu T et al. Effects of human milk and spermine on hydrogen peroxide-induced oxidative damage in IEC-6 cells. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41(4): 460-5.
- [59] Tsopmo A, Diehl-Jones BW, Aluko RE, Kitts DD, Elisia I, Friel JK. Tryptophan released from mother's milk has antioxidant properties. *Pediatr Res* 2009; 66(6): 614-8.
- [60] Yao L, Friel JK, Suh M, Diehl-Jones WL. Antioxidant properties of breast milk in a novel in vitro digestion/enterocyte model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 50(6): 670-6.
- [61] Shoji H, Oguchi S, Shimizu T, Yamashiro Y. Effect of human breast milk on urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion in infants. *Pediatr Res* 2003; 53(5): 850-2.
- [62] Shoji H, Shimizu T, Shinohara K, Oguchi S, Shiga S, Yamashiro Y. Suppressive effects of breast milk on oxidative DNA damage in very low birth weight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2004; 89(2): F136-8.
- [63] Ledo A, Arduini A, Asensi MA, Sastre J, Escrig R, Brugada M et al. Human milk enhances antioxidant defenses against hydroxyl radical aggression in preterm infants. *Am J Clin Nutr* 2009; 89(1): 210-5.
- [64] Agostoni C, Braegger C, Decsi T, Kolacek S, Koletzko B, Fleischer Michaelsen K et al. (ESPGHAN Committee on Nutrition): Breast-feeding: A commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49(1): 112-25.
- [65] Agostoni C, Buonocore G, Carnielli V, De Curtis M, Damaun D, Decsi T et al. (ESPGHAN Committee on Nutrition). Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010; 50(1): 85-91.
- [66] Braga LP, Palhares DB. Effect of evaporation and pasteurization in the biochemical and immunological composition of human milk. *J Pediatr (Rio J)* 2007; 83(1): 59-63.
- [67] Baro C, Giribaldi M, Aslanoglu S, Guiffrida MG, Dellavalle G, Conti A et al. Effect of two pasteurization methods on protein content of human milk. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011; 3: 818-29.
- [68] Ewaschuk JB, Unger S, O'Connor DL, Harvey S, Clandinin MT, Field CJ. Effect of pasteurization on selected immune components of donated human breast milk. *J Perinatol* 2011; 31(9): 593-8.
- [69] McPherson RJ, Wagner CL. The effect of pasteurization on transforming growth factor alpha and transforming growth factor beta 2 concentrations in human milk. *Adv Exp Med Biol* 2001; 501: 559-66.
- [70] Silvestre D, Miranda M, Muriach M, Almansa I, Jareño E, Romero FJ. Antioxidant capacity of human milk: effect of thermal conditions for the pasteurization. *Acta Paediatr* 2008; 97(8): 1070-4.
- [71] Ziegler EE. Meeting the nutritional needs of the low-birth-weight infant. *Ann Nutr Metab* 2011; 58 Suppl 1: 8-18.
- [72] Friel JK, Diehl-Jones B, Cockell KA, Chiu A, Rabanni R, Davies SS et al. Evidence of oxidative stress in relation to feeding type during early life in premature infants. *Pediatr Res* 2011; 69(2): 160-4.

