

Leche de burra en casos de alergia a la leche de vaca en humanos. Un desafío para Argentina

Luis Losinno ^{1*}, Ana Flores Bragulat ¹

1- Laboratorio de Producción Equina, Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina.

Palabras clave

Alergia
Leche-burra

Resumen. En humanos, las alergias alimentarias (AA), han sido calificadas como un problema emergente de salud pública en los países desarrollados. La alergia a las proteínas de la leche de vaca (APLV) es una respuesta inmune a determinadas proteínas presentes en la leche bovina que ocurre después de la ingestión de la misma y es una de las alergias de mayor prevalencia (0,5-4%) en niños de hasta un año de edad. Los principales alérgenos de la leche de vaca están distribuidos entre las fracciones del suero (20%) y de la caseína (80%). El tratamiento para APLV consiste en eliminar los productos lácteos de la dieta a fin de evitar la exposición a los alérgenos implicados. Debería proponerse a estos pacientes el sustituto menos alérgico. La fórmula extensamente hidrolizada de leche bovina contiene algunos epítopes que pueden ser reconocidos por el sistema inmune y causar reacciones alérgicas. En general, hay un 25–80% de niños con APLV que desarrollan una reacción cruzada con la fórmula que contiene soja, o leche hidrolizada de otras especies de rumiantes. La leche de burra es considerada una alternativa válida para los niños con APLV debido a su composición semejante a la leche humana, su probada tolerabilidad, palatabilidad, y su adecuada concentración de nutrientes como también la gran cantidad de compuestos bioactivos. Considerando la alta tasa de tolerabilidad encontrada en diversos estudios utilizando leche de burra, se ha propuesto que sea considerada como una fórmula hipoalérgica natural para el tratamiento de alergias a las proteínas de origen bovino. La producción de leche de burra en Sudamérica está en desarrollo y debería ser objeto de estudio en centros hospitalarios locales para que los niños afectados con APLV puedan acceder a productos de calidad y de mercado nacional para su consumo. Argentina cuenta con las posibilidades agroecológicas para la producción de leche de burra en particular en áreas áridas o semiáridas y bajo el formato de pequeñas producciones. Se podría contribuir al desarrollo socioeconómico de áreas marginales y a generar un producto natural de origen rural que podría ser una alternativa para los niños con APLV.

Citar como: Losinno, L., Flores Bragulat, A. (2019) Leche de burra en casos de alergia a la leche de vaca en humanos. Un desafío para Argentina. *Revista Científica FAV-UNRC Ab Intus* 3 (2): 81-99

Recibido: 10-11-18 - Aceptado: 27-3-19

*Autor para correspondencia: Luis Losinno, llosinno@gmail.com, Ruta Nac. 36, km 601, Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

Donkey milk in cow milk allergy in humans. A challenge to Argentina

Key words

Allergy
Milk – Jenny

Abstract. In humans, food allergies (FA) have been classified as a public health problem in developed countries. Cow's milk protein allergy (CMPA) is an immune response to the proteins present in cow's milk that occurs after ingestion. It is one of the most prevalent allergies (0.5-4%) in children up to one year of age. The main allergens in cow's milk are distributed between the fractions of whey proteins (20%) and casein (80%). The treatment for CMPA consists of eliminating dairy products from the diet in order to avoid exposure to the allergens involved. A hypoallergenic substitute should be proposed to these patients. The extensively hydrolysed formula of bovine milk contains some epitopes that can be recognized by the immune system and cause allergic reactions. In general, there is a 25-80% of children with CMPA who develop a cross reaction with the formula containing soy, or hydrolysed proteins of other ruminant species. Donkey milk is considered a valid alternative for children with CMPA due to its composition similar to human milk, its proven tolerability, palatability, and its adequate concentration of nutrients as well as the large number of bioactive compounds. Considering the high percentage of tolerability found in various studies in donkey milk, it has been proposed that it be considered as a natural hypoallergenic formula for the treatment of allergies to cow's milk proteins. The production of donkey milk in South America is beginning to develop successfully; donkey milk should be studied in local hospitals so that all children affected with CMPA can access quality products from the national market for consumption. Our country has the agro ecological possibilities for the production of donkey milk, particularly in arid or semi-arid areas and in the format of small productions. It could contribute to the socioeconomic development of marginal areas and generate a natural product of rural origin that could be an alternative for children with CMPA.

Alergias alimentarias en humanos

En humanos, las alergias alimentarias (AA), más frecuentes en la población pediátrica que en la adulta, han sido calificadas como un problema emergente de salud pública en los países desarrollados luego de las epidemias recientes de asma y rinitis alérgica (Renz *et al.*, 2018).

Las AA pueden obedecer a múltiples etiologías y factores predisponentes pero en general, clínicamente, se deben a una ruptura de los mecanismos de tolerancia a la exposición de antígenos provenientes de la ingesta de alimentos que pueden establecer inmunopatologías mediadas o no por Inmunoglobulina E (IgE) generando cuadros clínicos respiratorios, cardiovasculares,

gastrointestinales, dermatológicos o anafilaxis desde leves hasta muy severos que incluso pueden comprometer la vida.

El desarrollo de la tolerancia clínica e inmunológica a los antígenos de los alimentos y consecuentemente la inhibición de la respuesta alérgica del organismo es un fenómeno activo y complejo que depende de la generación de linfocitos T regulatorios antígeno-específicos (Noval-Rivas *et al.*, 2016) y es adquirido desde la vida prenatal y durante la vida extrauterina (Renz, 2011)

Las alergias en general y las alimentarias en particular son el resultado de una compleja interacción entre genética y ambiente. Muchos factores intrínsecos y extrínsecos pueden contribuir al desencadenamiento

de estos fenómenos incluyendo la dieta materna durante el embarazo y lactancia, el tipo de nacimiento (parto vaginal o cesárea) y consecuente exposición a determinados microorganismos, en especial los vaginales, la composición cualitativa y cuantitativa de la microbiota, tabaquismo activo o pasivo, en especial durante la gestación etc. (Cao, 2014; Chen 2016; Renz *et al.*, 2018). La microbiota intestinal de los bebés al nacimiento (que se ha postulado que adquieren *in útero* tempranamente) tiene una fuerte influencia en el riesgo de AA, está influenciada por el tipo de nacimiento (vaginal o cesárea) y factores ambientales como características del hogar (urbano o rural), hermanos, presencia de mascotas, dieta, medicaciones (en especial antibióticos), infecciones etc. (Benedé, 2016). La presencia de algunas especies del género *Clostridium* se han asociado a una mayor tolerancia a los alérgenos alimentarios (Ling, 2014; Jehangir *et al.*, 2015).

Se estima que alrededor de 11–26 millones de personas de la población europea sufren de AA (Eigemann, 2003). Si esta prevalencia fuera aproximadamente constante en todo el mundo y se proyectara a los aproximadamente 7.000 millones de personas que conforman la población mundial, se traduce en 220–520 millones de personas y representa un problema sanitario global de gran importancia (ISAAC, 2006; WHO, 2009).

Los cambios de incidencia en relación al tiempo se han estimado en base a estudios de alergia a los alimentos en general. Gupta (2011) determinó que las tasas de internación por millón de habitantes entre 1990 y 2004 aumentaron de 5 a 26 por causa de la anafilaxia, de 5 a 26 por AA y de 16 a 107 específicamente por AA pediátrica lo que claramente marca una tendencia creciente, evidenciada también en otros estudios informados recientemente (Meyhaudi *et al.*, 2018).

La prevalencia de las AA mediadas por IgE en niños es considerada alta en los países desarrollados donde se registran estadísticas de salud pública de manera sistemática pero globalmente se considera que es del orden de 1-5% con máximos de 10% como el caso de Australia (Osborne, 2011).

Las alergias al huevo y leche de vaca en general son características de la infancia temprana y la mayoría revierten durante la misma, a diferencia de las del maní y nueces que en general persisten toda la vida (Jo *et al.*, 2014).

En la Tabla 1 se observan los principales alérgenos alimentarios que afectan a los niños en diferentes países.

Tabla 1. Comparación de los tres principales alérgenos alimentarios en estudios con niños. (Adaptada de Ebisawa *et al.*, 2003)

País	1°	2°	3°
Alemania	Huevo	Leche de vaca	Trigo
España	Huevo	Leche de vaca	Pescado
Estados Unidos	Huevo	Leche de vaca	Maní
Israel	Huevo	Leche de vaca	Sésamo
Japón	Huevo	Leche de vaca	Trigo
Suiza	Huevo	Leche de vaca	Maní

Para una completa y actualizada revisión sobre las AA en humanos sugerimos los artículos de Dunlop y Keet (Inmunol Allergy Clin N Am, 2018) y Renz *et al.* (Nature Reviews, 2018) y para la anafilaxia inducida por alimentos el de Cianferoni y Muraro (2012).

Alergia a las proteínas de la leche de vaca

La leche de vaca es miembro de las “Big 8” como se conoce al grupo de los mayores alérgenos alimentarios, que incluyen además: huevo, soja, trigo, maní, nueces, pescado y mariscos en términos de prevalencia (Crittenden y Bennet, 2005)

La alergia a las proteínas de la leche de vaca (APLV) o *Cow’s Milk Allergy* (CMA) es una respuesta inmune a determinadas proteínas presentes en la leche bovina que ocurre después de la ingestión de la misma. Es una de las alergias de mayor prevalencia (0,5-4%) en niños de hasta un año de edad (Flom, 2019) y el pronóstico es en general favorable dado que en la mayoría de los casos (80-90%) se desarrolla tolerancia antes de los 3 años de edad (Venter, 2011; Savage, 2015; Lifschitz, 2015).

Las reacciones adversas luego de la ingestión de leche de vaca pueden ocurrir a cualquier edad desde el nacimiento y aun entre neonatos alimentados exclusivamente con leche materna, pero no todas esas reacciones son de naturaleza alérgica. En resultados de estudios epidemiológicos multicéntricos, los pacientes con APLV desarrollaron síntomas gastrointestinales en 32 a 60% de los casos, en la piel en 5 a 90% y

anafilaxia en 0,8 a 9% de los casos. Estas respuestas pueden ser: mediadas por IgE; no mediadas por IgE o mixta (combinada).

Si bien depende del tipo de estudio y la edad de los pacientes, la hipersensibilidad de tipo I (mediada por IgE) que ocurre entre algunos minutos y 2 horas post ingesta con síntomas respiratorios (tos, dificultad para respirar, jadeo); gastrointestinales (vómitos, diarrea, dolor abdominal); cardiovasculares (hipotensión, mareo, confusión); urticaria, opresión en la garganta, angioedema, se ha informado como la más frecuente (69%) (Boyce, 2012).

La forma no mediada por IgE, clínicamente incluye cuadros de proctitis/proctocolitis, enteropatías, síndrome de enterocolitis y síndrome de Heiner. El mecanismo de la intolerancia a la leche de vaca no está mediado por el anticuerpo IgE y dicho mecanismo se lo ha imputado a deficiencia de la funcionalidad de una enzima específica (con frecuencia denominada intolerancia a la lactosa), atribuible a la deficiencia de la B-galactosidasa (lactasa).

La forma mixta (mediada y no mediada por IgE) puede producir esofagitis y gastritis eosinofílicas y dermatitis atópica.

Stinzing y Zetterstrom (1979) describen una tasa de reacciones adversas a la leche de vaca de 2% en niños menores a un año de edad. De ellas 30% de los casos ocurrieron en el primer mes, 60% antes del tercero y 96% dentro del año. Schoemaker (2015) estudió la frecuencia de AA en 2049 niños de 9 países europeos desde el nacimiento hasta los dos años de edad y 69% los niños con APLV que fueron reevaluados un año luego del diagnóstico ya eran tolerantes a la leche de vaca.

Se ha informado que los niños tienen dos veces más riesgo de padecer APLV que las niñas y esto se revierte en la APLV de la vida adulta. Los individuos con APLV tienen mayor predisposición a padecer asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica (Host, 2002)

Existe evidencia que factores genéticos, epigenéticos y ambientales ejercen un papel muy importante en el desarrollo de la APLV (Savage, 2015; Jansen, 2018) y se ha estimado su heredabilidad en 0,15 (Tsai, 2009)

En Argentina, Meihady *et al.* (2018) realizaron un estudio retrospectivo de prevalencia de la

enfermedad en niños pacientes del Hospital Italiano de la ciudad de Buenos Aires entre los años 2004 y 2014. El 55,8% nació por cesárea y la edad promedio de la detección de APLV fue de 3,6 meses. Los síntomas de inicio más frecuentes fueron deposiciones con sangre (41,4%). En el 68,7% de los casos, los síntomas se iniciaron al momento de incorporación de los sustitutos de leche materna en base a leche de vaca. La prevalencia promedio en el periodo en estudio fue de 0.8% y varío durante el mismo de 0.4% en 2004 a 1.2% en 2014, triplicándose en 10 años. Es muy llamativo este hecho considerando que de acuerdo a un metanálisis hecho sobre 400.000 niños entre 1988 y 2011 en Estados Unidos, se estimó que el incremento de la prevalencia fue de 1,2% por década (Keet *et al.*, 2014). Es posible hipotetizar que no es probable que se deba a factores genéticos por lo que los factores ambientales adquieren más relevancia como la microbiota, alimentación de los lactantes y deficiencias de vitamina D.

Ha sido informado en múltiples publicaciones que la APLV puede generar severos trastornos en el crecimiento y desarrollo de los niños en los cuales persisten hasta la vida adulta debido a desequilibrios en micronutrientes esenciales y proteínas que pueden no ser cubiertos por las dietas sustitutivas (Robbins, 2014).

Los principales alérgenos de la leche de vaca están distribuidos entre las fracciones del suero (20%) y de la caseína (80%). Los alérgenos del suero incluyen α -lactoglobulina, β -lactoglobulina y la albumina sérica bovina. Los alérgenos de la caseína constan de cuatro proteínas diferentes (caseínas α_{s1} , α_{s2} , β y κ) que comparten escasa homología en su secuencia (Tabla 2). Los pacientes a menudo son más sensibles a las caseínas alfa (100%) y kappa (91,7%).

Los alérgenos de la leche de varias especies de mamíferos que reaccionan en forma cruzada adquieren importancia clínica dado que su utilización en pacientes puede generar problemas severos. La mayor homología se encuentra entre la proteína de la leche de vaca, oveja y cabra dado que *Bos* (bovinos), *Ovis* (ovinos) y *Capra* (caprinos) son géneros que pertenecen a la familia de rumiantes *Bovidae*. Las proteínas presentes en sus leches poseen menor similitud estructural que las provenientes de las familias de *Suidae* (cerdo), *Equidae* (caballo y burro) y *Camelidae* (camello y dromedario) y de las de los seres humanos.

Tabla 2. Homología de la secuencia de aminoácidos entre proteínas de la leche de vaca (en %). Adaptada de Fiocchi et al (2010).

Proteína	Cabra	Oveja	Búfala	Cerda	Yegua	Burra	Dromedario	Humana
ALA	95,1	97,2	99,3	74,6	72,4	71,5	69,7	73,9
BLG	94,4	93,9	96,7	63,9	59,4	56,9	Ausente	Ausente
AS	-	92,4	-	79,9	74,5	74,1	-	76,6
CAS α s1	87,9	88,3	-	47,2	-	-	42,9	32,4
CAS α s2	88,3	89,2	-	62,8	-	-	58,3	-
CAS β	91,1	92,0	97,8	67,0	60,5	-	69,2	56,5
CAS κ	84,9	84,9	92,6	54,3	57,4	-	58,4	53,2

ALA: α Lacto Globulina; BLG: β Lacto Globulina; AS: Albumina Sérica; CAS: Caseína; - :no medido.

Algunos alérgenos de la leche de vaca preservan su actividad biológica luego de la ebullición, pasteurización, proceso de ultra alta temperatura (UAT) o evaporación para la producción de fórmulas infantiles de sustitución en polvo. Para la obtención de estas fórmulas hipoalérgicas se necesitan múltiples procedimientos específicos como hidrólisis, tratamiento térmico, ultrafiltración y alta presión pero de todos modos, estudios comparativos no han mostrado diferencia en la antigenicidad entre las leches crudas y tratadas con calor (Werfel, 1999) y en algunos casos se ha demostrado la agregación de nuevos polímeros de proteína capaces de unir IgE específica. Luego de la ebullición durante 10 minutos, se incrementaron las formas poliméricas de dímeros, trímeros y polímeros mayores y todas esas formas mantuvieron sus propiedades de unión a IgE (Restani, 2004).

Esta persistencia de alergenidad en la leche termotratada está confirmada clínicamente por el hecho de que en algunos casos, la APLV se desarrolló luego de la ingestión de leche tratada con calor. Además, los procesos de calentamiento solo pueden modificar los epítopes conformacionales, que podrían perder sus capacidades de unión a anticuerpos IgE específicos, mientras que los epítopes secuenciales mantienen su potencial alérgico aun después del calentamiento (Sampson, 2004). Las proteínas de la leche contienen ambos tipos de epítopes y, aunque puede observarse una

ligera reducción de la antigenicidad con las proteínas del suero, se informaron alteraciones insignificantes en las propiedades de unión con las caseínas. Para complicar aún más la situación, el calentamiento vigoroso (como el utilizado para ciertos procesos de esterilización [121°C durante 20 minutos]) y también el proceso de pasteurización, menos drástico, han demostrado, incrementar algunas características alérgicas (Roth-Walter, 2005). Además, las proteínas de la leche pueden oxidarse durante el tratamiento industrial, lo cual da resulta en la formación de residuos de aminoácidos modificados/oxidados, en particular en β Lactoglobulina, que puede ser la responsable de desarrollar nuevas estructuras inmunológicamente reactivas (Fenaille, 2005).

Amamantamiento natural y causas de supresión o contraindicaciones en humanos

Para Linneo (1758), la lactación era uno de los caracteres dominantes en la identificación de las especies que más tarde serían conocidas como mamíferos a través de su denominación de *Mammalia* (Linnaeus, 1758). De alguna manera esto refleja la importancia de la lactación durante la vida temprana de todos los mamíferos, incluyendo a los humanos (Lefevre *et al.*, 2010).

De acuerdo con la notificación de la Organización Mundial para la Salud (*Razones médicas aceptables para el uso de sucedáneos de leche materna*, OMS-UNICEF, 2009)

“casi todas las madres pueden amamantar exitosamente, lo que significa iniciar la lactancia materna durante la primera hora de vida, dar lactancia materna exclusiva durante los primeros seis meses y continuar la lactancia (además de alimentación complementaria apropiada) hasta los dos años de edad o más”.

Múltiples razones biológicas, evolutivas y médicas demuestran que la lactancia materna, al menos durante los primeros meses de vida, es de mutuo beneficio para madres y lactantes. Se ha demostrado que en éstos reduce el riesgo de infecciones productoras de diarrea, neumonía, otitis, meningitis, infección urinaria e infección por *Haemophilus influenzae* (OMS, 2005) y condiciones crónicas como diabetes tipo I y tipo II, enfermedad de Cohn, colitis ulcerativa, sobrepeso y obesidad en la adolescencia, menor presión arterial y colesterol sérico (OMS, 2007) y en las madres reduce el riesgo de hemorragia post parto, cáncer de mama premenopáusicas y cáncer de ovario (Organización Panamericana de la Salud, 2002)

A pesar de lo expresado, globalmente, solo el 38% de los niños son alimentados con leche materna durante las etapas tempranas de la vida. En Estados Unidos solo el 75% de los niños inician el consumo de leche materna desde el nacimiento; a los tres meses de vida, el 67% de los niños dependen de fórmulas comerciales como parte de la dieta para cubrir sus requerimientos nutricionales. Entre las madres primerizas, la proporción de amamantamiento hasta los seis meses es de 43% y solo el 13% cumple con la recomendación (Martin *et al.*, 2016). El 66% de los hospitales en Estados Unidos informaron la distribución de fórmulas comerciales a las madres en amamantamiento (AAP, 2012), lo cual genera una mal interpretación del consumo de sustitutos lácteos y aumenta el consumo de proteínas de leche de vaca antes de los seis meses de vida, un factor de riesgo muy importante para el posterior desarrollo de APLV.

El “*periodo de los mil días*” en humanos, se refiere al período comprendido desde el embarazo hasta que el niño cumple dos años y es allí cuando una óptima nutrición es considerada crítica para el desarrollo del

cerebro, su tasa de crecimiento y muchos aspectos de su salud futura. Desafortunadamente solo un tercio de las madres llega al peso adecuado durante la gestación y 16% de ellas tiene deficiencia de hierro. Al menos el 20% de los niños nunca amamantaron y durante el primer año de vida, menos de la mitad han consumido algún vegetal, pero el 30% consume al menos una bebida azucarada por día (NIH Public Health Grand Rounds, 2019).

Aun así, hay algunas condiciones y situaciones particulares, de baja frecuencia poblacional pero de alto impacto en los individuos, en que podría ser recomendable, según la OMS, no amamantar de manera temporal o permanente según cada caso particular (contemplando los riesgos y beneficios) y sería necesario el uso de sucedáneos de la leche materna, tanto de origen animal como sintético, algo que desarrollaremos más adelante.

Transcribimos textualmente estas situaciones y casos de acuerdo a las recomendaciones de la OMS-UNICEF, 2010.

AFECCIONES INFANTILES

A1. Lactantes que no deben recibir leche materna ni otra leche excepto fórmula especializada

Lactantes con galactosemia clásica: se necesita una fórmula especial libre de galactosa.

Lactantes con enfermedad de orina en jarabe de arce: se necesita una fórmula especial libre de leucina, isoleucina y valina.

Lactantes con fenilcetonuria: se requiere una fórmula especial libre de fenilalanina (se permite algo de lactancia materna, con monitorización cuidadosa).

A2. Recién nacidos para quienes la leche materna es la mejor opción de alimentación, pero que pueden necesitar otros alimentos por un periodo limitado además de leche materna

Lactantes nacidos con peso menor a 1500 g (muy bajo peso al nacer).

Lactantes nacidos con menos de 32 semanas de gestación (muy prematuros).

Recién nacidos con riesgo de hipoglicemia debido a una alteración en la adaptación

metabólica, o incremento de la demanda de la glucosa, en particular aquellos que son prematuros, pequeños para la edad gestacional o que han experimentado estrés significativo intra-parto con hipoxia o isquemia, aquellos que están enfermos y aquellos cuyas madres son diabéticas si la glicemia no responde a lactancia materna óptima o alimentación con leche materna.

AFECCIONES MATERNAS

Las madres afectadas por alguna de las condiciones mencionadas abajo deberían recibir tratamiento de acuerdo a guías estándar.

B1. Afecciones maternas que podrían justificar que se evite la lactancia permanentemente

Infección por VIH: si la alimentación de sustitución es aceptable, factible, asequible, sostenible y segura.

B2. Afecciones maternas que podrían justificar que se evite la lactancia temporalmente

Enfermedad grave que hace que la madre no pueda cuidar a su bebé, por ejemplo septicemia.

Herpes simple Tipo I (HSV-1): se debe evitar contacto directo entre las lesiones en el pecho materno y la boca del bebé hasta que toda lesión activa se haya resuelto.

Medicación materna:

Los medicamentos psicoterapéuticos sedativos, antiepilépticos, opioides y sus combinaciones pueden causar efectos colaterales tales como mareo y depresión respiratoria, por lo que deben evitarse si existen alternativas más seguras disponibles.

Es recomendable evitar el uso de yodo radioactivo-131 debido a que está disponibles opciones más seguras - la madre puede reiniciar la lactancia pasados dos meses de haber recibido esta sustancia

El uso excesivo de yodo o iodóforos tópicos (yodo-povidona), especialmente en heridas abiertas o membranas mucosas, puede resultar en supresión tiroidea o anomalías electrolíticas en el bebé amamantado y

deberían ser evitados

La quimioterapia citotóxica requiere que la madre suspenda el amamantamiento durante la terapia.

B3. Afecciones maternas durante las cuales puede continuar la lactancia, aunque representan problemas de salud preocupantes

Absceso mamario: el amamantamiento debería continuar con el lado no afectado; el amamantamiento con el pecho afectado puede reiniciarse una vez se ha iniciado el tratamiento.

Hepatitis B: los lactantes deben recibir la vacuna de la hepatitis B, en las primeras 48 horas o apenas sea posible después.

Hepatitis C.

Mastitis: si la lactancia es muy dolorosa, debe extraerse la leche para evitar que progrese la afección.

Tuberculosis: el manejo de la madre y el bebé debe hacerse de acuerdo a las normas nacionales de tuberculosis.

Uso de sustancias:

Se ha demostrado que el uso materno de nicotina, alcohol, éxtasis, anfetaminas, cocaína y estimulantes relacionados tiene un efecto dañino en los bebés amamantados

Alternativas naturales de sustitución de leche de vaca en casos de APLV

Dadas estas situaciones clínicas particulares y posiblemente otros escenarios relacionados a cuestiones culturales, laborales y personales en los cuales se deba suprimir o acortar la lactancia materna, se han desarrollado históricamente alternativas de sustitución con leches de mamíferos domésticos, principalmente los rumiantes (bovinos, caprinos y ovinos) desde hace al menos 11.000 años (Beja-Pereira *et al.*, 2006) seguidos (en particular algunas áreas geográficas como la mediterránea y oriente asiático) por las del género *Equus* (yegua y burra).

Ya hemos analizado los problemas que puede generar la alergia a determinadas proteínas de la leche de vaca y la leche de otros rumiantes como la cabra y la oveja debido a la alta homología en los alérgenos. Como alternativas, históricamente se consideró la leche de burra como la menos alergénica por tener la composición más parecida a la leche humana y ha sido utilizada empíricamente hasta años recientes como una herramienta natural para los casos de APLV (Conti *et al.*, 2007). El problema (además que es posible, aunque de baja frecuencia, que origine reacciones cruzadas) ha sido, al menos hasta el presente, la disponibilidad en el mercado.

Paralelamente, la industria ha desarrollado fórmulas de sustitución basadas en proteína animales o vegetales tratadas y suplementadas que han sido utilizadas con eficacia clínica hasta el presente, si bien hay cuestionamientos en los estudios realizados debido a la falta de controles, diagnósticos no precisos, sobre-diagnóstico y severos conflictos de interés (informados y no informados) por parte de los investigadores en estudios financiados (directa o indirectamente) por las compañías productoras de dichas fórmulas (Tulleken, 2018).

La norma general para el tratamiento de la APLV es dietaria y consiste en eliminar los productos lácteos de la dieta a fin de evitar la exposición a los alérgenos implicados. Debería proponerse a estos pacientes el sustituto menos alergénico con el objetivo de maximizar el poder de diagnóstico de la dieta de eliminación. En principio también debería considerarse la abstinencia de consumo de carne bovina en estos pacientes ya que los productos lácteos y la carne contienen proteína antigénica común y hasta el 20% de los niños pueden, además, ser alérgicos a la carne de vaca (De Boissieu, 2002).

En niños de dos años de edad o mayores o durante el periodo de lactancia materna, podría no ser necesaria la utilización de una fórmula o dieta de sustitución, pero en bebés que no son alimentados a leche materna y en menores de 2 años, es obligatoria la sustitución con una fórmula equilibrada o una dieta natural balanceada y equivalente.

La fórmula extensamente hidrolizada de leche

bovina contiene algunos epítopes que pueden ser reconocidos por el sistema inmune y causar reacciones alérgicas (Del Giudice *et al.*, 2015; Polidori *et al.*, 2015). En general, hay un 25–80% de niños con APLV que desarrollan una reacción cruzada con la fórmula que contiene soja o leche hidrolizada de otras especies de rumiantes (Swar, 2011). Con respecto a los suplementos que contienen soja, es importante recordar la presencia de fitoestrógenos, los cuales en adultos no son perjudiciales ya que la dieta es variada, pero pueden tornarse peligrosos en caso que la dieta solo este basada en este alimento, además otros componentes pueden causar daño en los infantes como los fitatos que pueden afectar el metabolismo del yodo (D'Auria *et al.*, 2011).

La razón por la cual la fórmula de aminoácidos no se recomienda en los niños con bajo riesgo de anafilaxis es por su alto costo. Además, tanto la leche altamente hidrolizada como la fórmula de aminoácidos son poco aceptadas por los niños debido a su baja palatabilidad (Barni *et al.*, 2018)

Los sustitutos que se utilizan están relacionados a la disponibilidad, costo, cobertura social y médica, aspectos culturales, etc. pero en la actualidad se considera que no hay una fuente única, integral y perfectamente balanceada y adecuada para niños con APLV. Es por esto que consideramos algunos aspectos conceptuales a ser analizados al momento de decidir una dieta basados en algunas de las recomendaciones establecidas en las *Pautas de la Organización Mundial sobre Alergia para el Diagnóstico y Fundamento de la Acción contra la Alergia a la Leche de Vaca (DRACMA)* (Fiocchi *et al.* *Diagnostic and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy. Pediatrics Allergy Immunol 2010: (Suppl. 21) 1–125*)

El contenido proteico de la leche humana es menor que el de los animales rumiantes: vaca, búfalo, yak, camello, cabra, oveja, reno, pero es similar a la leche de burra y yegua

La leche humana no contiene β -lacto globulina, uno de los mayores alérgenos en la leche de vaca, en forma similar a la leche de camello y dromedario

La proporción de caseína dentro de la fracción proteica total es menor en la leche humana entera, las proteínas séricas son mayores que en la leche de vaca, búfalo y oveja y más similar a la leche de burro y yegua.

Las leches de yegua y burra tienen un contenido proteico total similar a la leche humana y una menor proporción de proteínas de caseína a suero de leche. La fracción proteica es rica en proteínas de suero (35–50%). Su proporción Calcio/Fósforo es de 1.7 cercana al valor óptimo para la absorción y metabolismo del calcio. La leche de yegua también contiene grandes cantidades de ácido linoleico y linolénico.

Existe una homología sustancial entre la fracción proteica de leche de vaca, oveja y cabra.

Debido a las diferencias entre las secuencias de aminoácidos de las proteínas de bovinos y equinos, los epítopes relevantes para la unión de IgE a la leche de vaca son diferentes o completamente ausentes y la reactividad cruzada entre la leche de equino y bovino es baja.

La leche de burro es similar a la leche de yegua en cuanto a su composición, y está fácilmente disponible en algunos países del Mediterráneo. Los estudios sobre su alergenicidad y tolerancia entre pacientes con síntomas gastrointestinales concluyeron que es un sustituto posible de la leche bovina en el manejo lácteo de estas afecciones de inicio tardío mediadas o no por la IgE (Iacono et al., 1992; Carroccio et al., 2000).

En la APLV mediada por IgE Adquirida por contacto, se informó una tolerancia del 82,6% a la leche de vaca en una cohorte de niños con APLV con síntomas heterogéneos (Monti et al., 2007). En este estudio en particular, el 21,2% de los niños con APLV inmediata reaccionaron a la leche de burro. Por ende, el riesgo potencial de reactividad cruzada entre las proteínas de la leche de vaca y de burro está lejos de ser teórico, sugiriendo la necesidad de más estudios in vivo e in vitro antes de poder recomendar esta leche en este escenario (Alessandri et al. 2007).

- En una población de niños con dermatitis atópica y APLV leve, la mayoría de los cuales

toleraron la leche de cabra, también toleraron la leche de burro un 88% de los niños (excluyendo aquellos con síntomas inmediatos) (Vita et al., 2007).

La leche de équidos se puede considerar un sustituto válido de la leche de vaca, en particular, pero no exclusivamente, en niños con APLV de inicio tardío. Como se disponibilidad es limitada y no se usa en la industria alimentaria, no es económicamente probable adaptarla para el uso en lactantes. Sin embargo, dada su calidad proteica, productos comerciales adecuadamente procesados harían de ella una adecuada fuente de proteínas para los lactantes con APLV. En este artículo nos referiremos exclusivamente a la leche de burra como alternativa de utilización en casos de APLV y no a las formulas artificiales cuya composición y usos han sido objeto de múltiples revisiones.

Composición de la leche de burra

Existe una gran diferencia en la composición de la leche de las especies de mamíferos, por ejemplo el contenido graso puede variar desde 0-2% en el rinoceronte negro a 60% en la foca. Si bien se reconoce la gran importancia de los aspectos filogenéticos, las dietas y la duración de la lactación en la composición de la leche, muchos aspectos ecológicos y evolutivos de las especies como adaptación a ambientes áridos son actualmente considerados (Skibieli et al., 2013).

La leche está formada por múltiples compuestos que pueden encontrarse en diversas proporciones algunos de los cuales se conocen y pueden ser medidos, como proteínas, ácidos grasos, azúcar, minerales, vitaminas, células somáticas etc., y otros que se desconocen o que han sido informados como las biomoléculas, pero su cantidad y sus funciones todavía no están determinadas con exactitud (Aspri et al., 2016). Los péptidos bioactivos pueden estar presentes dentro del peptidoma de la leche y ser liberados por actividad enzimática durante la digestión (Piovesana et al., 2015).

El burro o asno (*Equus asinus*) es un miembro de la familia *Equidae* a la cual también pertenecen los caballos y las cebras. Los antecedentes evolutivos

de esta especie se remontan al asno norafricano (*Equus africanus*) que fue domesticado hace más de 6.000 años estableciendo una estrecha relación con el humano como animal de trabajo y, debido a su gran docilidad, muy tempranamente como productor de leche (Chiofalo *et al.*, 2015). La leche de burra contiene una baja cantidad de materia seca, aproximadamente 9,5 g/100ml. constituida principalmente por proteínas, grasas y lactosa (Tabla 3)

Tabla 3. Composición de la leche de burras de la raza Amiata (n= 124) (Adaptada de: Ragona *et al.*, 2016).

Composición	g/100mL
Proteínas	1,57
Caseína	0,75
Grasas	0,4
Lactosa	7,23
Cenizas	0,37
Materia seca	9,38

Dentro de las proteínas se reconocen la α y β caseínas que se encuentran en concentraciones bajas con respecto a la leche bovina y en similar concentración con respecto a la leche humana. Proteínas del suero como α -lacto albúmina, en mayor concentración en leche humana luego en leche de burra y por último en leche bovina; β -lacto globulina ausente en leche humana y en menor concentración en leche de burra con respecto a la leche bovina; inmunoglobulinas (Igs), se encuentran en mayor proporción IgA en leche materna y leche de burra (Tabla 4). La lisozima, con una función antibacteriana, se encuentra en una proporción alta en la leche de burra como puede observarse en la Tabla 6, lactoferrina, lactoperoxidasa, enzimas e inhibidores de enzimas y factores de crecimiento (Vincenzetti *et al.*, 2012). Las β -lacto globulinas aunque están presentes en la leche de burra se comprobó que son capaces de ser digeridas en un 70% por los humanos, mientras que las provenientes de bovinos solo se digieren en un 40% (Marletta *et al.*, 2016). El contenido de lípidos en leche de burra es muy inferior al valor estimado para leche humana y leche de bovinos. Los lípidos predominantes son

los ácidos grasos poliinsaturados.

La alta proporción de lactosa, que dobla en su concentración a la presente en leche bovina y su cantidad se asemeja a la de la leche humana, es la principal razón de la alta palatabilidad que se le atribuye a la leche de burra y por lo cual es fácilmente aceptada por los niños en contraste con las fórmulas hidrolizadas y a base de aminoácidos (Monti *et al.*, 2012; Mori *et al.*, 2017).

Tabla 4. Composición comparada entre leche humana, bovina y de burra (Adaptada de Chiofalo *et al.*, 2015)

Composición	Burra	Humana	Bovina
pH	7,0 – 7,2	7,0 - 7,5	6,6 – 6,8
Proteínas g/100g	1,5 – 1,8	0,9 – 1,7	3,1 – 3,8
Grasas g/100g	0,3 – 1,8	3,5 – 4,0	3,5 – 3,9
Lactosa g/100g	5,8 – 7,4	6,3 – 7,0	4,4 – 4,9
Solidos Totales g/100g	8,8 – 11,7	11,7 – 12,9	12,5 – 13
Caseínas %	47,3	26	77,2
Proteínas del suero %	37	53,5	17,5

En la Tabla 5 se detallan las vitaminas encontradas en las distintas leches y su concentración. En cuanto a los minerales, la leche de burra contiene concentraciones semejantes a la leche humana salvo por una mayor concentración de calcio y fósforo pero que, finalmente la relación en la que se encuentran es similar (Aspri *et al.*, 2016).

Tabla 5. Contenido de vitaminas en diferentes tipos de leche. (Aadaptada de Aspri *et al.*, 2016)

Vitaminas (mg/L)	Burra	Vaca	Humana
Vitamina A	0,017	0,32 - 0,50	0,3 - 0,7
Vitamina E	0,051	0,98 - 1,28	3 - 8
Vitamina C	3,5 - 5,0	0,94	50 - 100
Vitamina B1	0,41	0,37	0,003 - 0,015
Vitamina B2	0,64	1,80	0,4 - 0,6
Vitamina B3	0,74	0,90	1,70
Vitamina B12	1,10	0,004	0,50

Tabla 6. Contenido de Lactoperoxidasa, lisozima y lactoferrina en leche. (Adaptada de Polidori y Vincenzetti, 2012)

Leche	Lactoperoxidasa (mg/L)	Lisozima (g/L)	Lactoferrina (g/L)
Humana	0,77	0,12	0,3 - 4,2
Burra	0,11	1	0,08
Vaca	30 - 100	trazas	0,1

Un estudio reciente muestra que el análisis microbiológico de la leche cruda de burra contiene un rango de 3,10 a 4,09 log ufc/mL⁻¹ con un promedio de 3,69 log ufc/mL⁻¹ comparado con el alto conteo en otras especies como vacas, cabras y ovejas. También fueron detectados bajos niveles de células somáticas, con un rango de 4,01 a 4,87 log cel/mL⁻¹, un parámetro que suele ser indicativo de la calidad de la leche (Massouras *et al.*, 2017)

En leche de burra cruda la actividad antimicrobiana es sobre todo atribuida al alto contenido de lisozima cuya acción inhibitoria del crecimiento microbiano en el tracto digestivo en conjunto con la lactoferrina e inmunoglobulinas, contribuye a disminuir la incidencia de infecciones gastrointestinales especialmente durante la infancia (Baldi *et al.*, 2005; Gubić *et al.*, 2016). Además, posee factores antimicrobianos naturales (péptidos bioactivos y biomoléculas), recientemente demostrados (Aspri *et al.*, 2016); y un Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) que ha sido asociado a la integridad y la salud de la mucosa gastrointestinal, un efecto valioso sobre todo en niños, ancianos y enfermos convalecientes inmunodeprimidos (Scaffizari *et al.*, 2009; Brumini *et al.*, 2016).

Antecedentes del uso de leche de burra en humanos

Históricamente existen evidencias del uso de la leche de burra en occidente desde hace más de 2000 años entre otros partir de los escritos (*Corpus Hippocraticum*) de Hipócrates (2.480-2.390 A.P.) como tratamiento para la artritis, tos, heridas quirúrgicas, úlceras y disenterías. Ibn Sina (Avicena) (1.039 A.P.) en su célebre *Al Qanum* (conocido como Canon de Avicena, su monumental obra médica de 14 volúmenes escrita alrededor del año 1.020) aconsejaba su uso para fortalecer los dientes, en el tratamiento de la tos, hemoptisis, úlceras, heridas

y ascitis (Swar, 2011). Los antecedentes de su utilización en terapéutica humana en la medicina tradicional china (que se continúan hasta el presente) se remontan a más de 3.000 años y hasta el presente.

Estudios clínicos recientes demostraron la actividad inmunomoduladora de la leche de burra en relación con el mantenimiento de la microbiota normal del intestino en humanos. El mantenimiento de las bacterias adecuadas sustenta un equilibrio en el sistema inmunitario intestinal y disminución de estados inflamatorios subclínicos asociados al mejor metabolismo de los lípidos y glucosa. Los autores sugieren que esta mejora en el metabolismo puede ser un factor de protección ante problemas metabólicos que puedan desarrollarse posteriormente (Trinchese *et al.*, 2015).

La enfermedad de Crohn en humanos es una patología inflamatoria crónica del intestino. La patogénesis está parcialmente atribuida a un desbalance en la microbiota intestinal donde hay un grado de inflamación inmunomediada en sujetos con predisposición genética. Actualmente la estrategia de tratamiento es revertir los cambios en la flora con el uso de ciertos antibióticos y prebióticos. En un estudio en ratones, la administración de leche de burra fue efectiva como tratamiento complementario debido a la presencia de lisozima y la acción de la misma en el mantenimiento de la microbiota intestinal (Yvon *et al.*, 2016).

Se ha propuesto a la leche de burra como un nutracéutico para la nutrición humana debido a su composición en ácidos grasos y triglicéridos, no solo para niños lactantes sino para pacientes con procesos de osteogénesis, senescencia prematura, enfermedad coronaria o en terapia hipocolesterolemia en pacientes con aterosclerosis (Chiofalo y Salimei, 2001; D'Alessandro *et al.*, 2010). También su composición lipídica se caracteriza por sus efectos prebióticos y probióticos con efectos sobre el microambiente intestinal e inmunidad (Amati *et al.*, 2010).

Muchos estudios han evaluado la actividad antiproliferativa, anticancerígena de leche de distintos mamíferos domésticos. Acka *et al.* (2019) demostraron *in vitro* el potencial daño genotóxico que induce la leche de burra en células cancerígenas de pulmón, sin encontrar cambios en

células normales de pulmón incluso en mayores concentraciones.

De todos modos la utilización de la leche de burra como terapia en países occidentales todavía encuentra dificultades relacionadas a la provisión continua de la misma y a los riesgos médicos legales de la administración de terapias dietarias no convencionales (Chiofalo *et al.*, 2015)

Leche de burra en casos de APLV

La leche de burra es considerada una alternativa válida para los niños con APLV debido a su composición semejante a la leche humana, su probada tolerabilidad, palatabilidad, y su adecuada concentración de nutrientes como también la gran cantidad de compuestos bioactivos (Monti *et al.*, 2012; Polidori y Vincenzetti, 2012; Salimei y Fantuz, 2012; Polidori *et al.*, 2015). Aunque cabe destacar su baja fuente de calorías, por su baja concentración de lípidos, por lo cual debe considerarse no utilizarlo como alimento único en los niños con APLV y ser agregada otra fuente de energía (D'Auria *et al.*, 2011).

El uso de leche de burra para niños con APLV ha sido objeto de varios estudios de palatabilidad y tolerabilidad con resultados consistentes y positivos entre ellos respecto a estas variables. Barni (2018) describe resultados sobre 70 niños entre 6 meses y 18 años de edad con APLV mediada por IgE, que fueron suplementados con leche de burra con una tolerabilidad del 98,5%. En otro estudio con 46 niños de una edad promedio de 36 meses con AA múltiples entre ellas APLV probada, sujetos a dietas muy restrictivas (leche materna no disponible), algunos intolerantes a la leche a base de soja y a la fórmula de leche de vaca extensamente hidrolizada (todos rechazaron la fórmula hidrolizada y la fórmula de aminoácidos debido a su baja palatabilidad), la leche de burra fue inmediatamente aceptada por su palatabilidad y se encontró una tolerancia de 91% incluyendo pacientes intolerantes a la fórmula hidrolizada. La leche de burra fue tolerada por todos los niños cuya alergia no estaba mediada por IgE, y por el 78,8% de los niños con alergia mediada por IgE (Monti, 2007). Más tarde, en 2012 el mismo autor informó una alta tolerabilidad (90,2%) a la

leche de burra en niños con APLV probada y en los cuales el 89% presentaba otras AA asociadas. No encontraron diferencia en la tolerancia a la leche de burra entre alergias mediadas y no mediadas por IgE. En los pacientes con AA múltiples que tienen dietas particularmente restrictivas y monótonas, es importante identificar productos que puedan suplantar a la leche de origen bovino, soja u otros rumiantes y que tengan buena palatabilidad para que sean aceptados como parte de la dieta (Monti *et al.*, 2012).

Vita (2007) describe un estudio *cross over* hecho sobre 28 niños con APLV a los cuales se les administró leche de cabra y leche de burra durante tres meses. Los resultados indicaron que la leche de burra fue tolerada por el 88% de los niños con APLV, por el contrario en todos los niños que recibieron leche de cabra los síntomas no cambiaron e incluso empeoraron (Vita, 2007).

Las pautas de la Academia Americana de Pediatría (AAP, 2000) establecen para etiquetar una fórmula infantil como hipoalérgica, que ésta debe ser clínicamente tolerada por al menos el 90% de los sujetos con APLV. Considerando el alto porcentaje de tolerabilidad encontrado en diversos estudios en leche de burra, se ha propuesto que sea considerada como una fórmula hipoalérgica natural para el tratamiento de alergias a las proteínas de origen bovino (Vincenzetti *et al.*, 2014; Barni *et al.*, 2018)

En niños que han sufrido reacciones anafilácticas, la leche de burra sigue siendo una alternativa pero su introducción debe hacerse con precaución y estar restringida al ámbito hospitalario (Monti *et al.*, 2012).

Como se mencionó anteriormente la leche de burra no puede ser considerada como alimento único de infantes en lactación por ser hipocalórica. Sin embargo debería ser tenida en cuenta en el momento de realizar fórmulas para lactantes con APLV, como fuente de proteínas y de compuestos bioactivos. Éstos últimos, como es el caso de la lisozima es necesaria para el desarrollo de una flora intestinal normal y no está incorporada en todas las fórmulas ya que, o bien debe ser aislada de leche de mujeres o generada como un compuesto recombinante a través de animales o plantas genéticamente modificados (Sourrolas *et al.*, 2018).

En conclusión, hay una gran deficiencia de divulgación de información acerca de la importancia del amamantamiento exclusivo hasta los seis meses de vida, lo que mejora la calidad de vida de los niños y reduce la predisposición a AA provocadas por la incorporación temprana de proteínas que actúan como alérgenos. Sumado a esto, todavía es escasa la cantidad de información sobre cuál es el protocolo a seguir en caso de APLV, las fórmulas disponibles en el mercado contienen proteínas de vaca, soja, arroz, etc. que, como ya se demostró en diversos estudios no es la mejor fuente de proteínas para niños con esa afección y carecen de sustancias bioactivas muy importantes para el correcto desarrollo tanto intestinal como inmunológico de los recién nacidos. Consideramos importante el estudio de la leche de burra para el desarrollo de fórmulas alternativas para niños lactantes con APLV que sean altamente palatables, con una cantidad y calidad proteica adecuada.

Producción de leche de burra

La revalorización de la leche de burra como alimento, ha incentivado la producción en países como Italia, Francia, Croacia, Albania, Bulgaria, Grecia, Turquía, Túnez, etc. en particular luego de la normativa de la Unión Europea referida a la calidad de alimentos de origen animal para humanos (EC# 853/2004), que marca estándares de higiene y producción y contribuye a preservar la biodiversidad en especial de razas nativas seleccionadas por cientos de años para la producción de leche.

Si bien en general las producciones de “lecherías (o tambos) de burras” varían entre 5 y 600 animales, se considera que la mayoría se encuentran en la escala de pequeños a medianos productores con un promedio de 30-40 animales en producción bajo sistemas pastoriles con una producción de 0,5 a 2 L/ día y lactancias promedio de seis meses. La producción de leche de burra en países de la Unión Europea se ha estimado en 300 toneladas anuales (Eurolactis, 2016; Valle *et al.*, 2017).

La producción de leche de burra en Sudamérica está comenzando a desarrollarse con éxito, con la apertura de varios centros de producción en los últimos años, por lo cual la leche de burra debería ser objeto de estudio en centros hospitalarios de

Argentina para que los niños afectados con APLV puedan acceder a productos de calidad y de mercado nacional para su consumo, tales como leche cruda pasteurizada congelada, en polvo y como base de fórmulas balanceadas para diferentes etapas de los lactantes.

Nuestro Laboratorio ha comenzado desde 2014 una línea de trabajo en sistemas de producción de leche de burra en Argentina generando programas internacionales subsidiados de investigaciones específicas con las universidades de Beijing (China), Pisa (Italia), Barcelona (España), El Cairo (Egipto), Austral (Chile), Buenos Aires, La Pampa, Córdoba (Argentina), institutos de investigación (CONICET) y empresas productoras (Catamarca y Santa Fe, Argentina).

Como resultados preliminares de estos programas de cooperación se han conformado grupos de investigación multidisciplinarios internacionales como los mencionados, la formación de la Donkey Science Society y la ejecución del International Symposium on Donkey Science (ISDS) cuya primera sesión tuvo lugar en Shandong, China en 2017 (Zeng y Losinno, 2017).

Conclusiones

Las AA debidas a proteínas de la leche de vaca son un problema de salud pública humana de relevancia en particular en niños y según los datos disponibles, en crecimiento, inclusive en Argentina. Nuestro país cuenta con las posibilidades agroecológicas suficientes y óptimas para la producción de leche de burra en particular en áreas áridas o semiáridas y bajo el formato de pequeñas producciones sustentables dado que la especie es de alta adaptabilidad y bajos requerimientos nutricionales. Con esto podríamos contribuir al desarrollo socioeconómico de áreas marginales y a generar un producto natural de origen rural que podría ser una alternativa para los niños con APLV.

Referencias

- Akca, C., Vatan, O., Yilmaz, D., Huriyet, H., Cinkilic, N., Cavas, T. (2019): In vitro cytotoxic and genotoxic effects of donkey milk on lung cancer and normal cells lines. *Czech Journal of Food Sciences*, 37: 29-35.
- Alessandri, C., Mar, i A. (2007) Efficacy of donkey's milk in treating cow's milk allergic children: major concerns. *Pediatric Allergy and Immunology* 18: 625–626.
- Amati L., Marzulli G., Martulli M., Tafaro A., Jirillo F., Pugliese V., et al. (2010). Donkey and goat milk intake and modulation of the human aged immune response. *Current Pharmaceutical Design*; 16:864–9.
- American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition (2000). Hypoallergenic Infant Formulas. *Pediatrics*; 106:346-349.
- American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition (2012). Breastfeeding and the Use of Human Milk. *Pediatrics*; Volume 129, Issue 3.
- Aspri, M., Economou, N., Papademas, P. (2016). Donkey milk: An Overview on Functionality, Technology and Future Prospects. *Food Reviews International* <https://doi.org/10.1080/87559129.2016.1175014>
- Baldi, A., Politis, I., Pecorini C., Fusi E., Chronopoulou R, Dell'Orto V. (2005) Biological effects of milk proteins and their peptides with emphasis on those related to the gastrointestinal ecosystem. *Journal Dairy Research*. 72:66–72. DOI: 10.1017/S002202990500110X
- Barni S., Sarti L., Mori F., Muscas G., Belli F., Pucci N., Novembre E. (2018). Tolerability and palatability of donkey's milk in children with cow's milk allergy. *Pediatric Allergy and Immunology*, Vol 29, (3) 329-331.
- Beja-Pereira, A., Bertorelle, G. et al. (2006). The origin of European cattle: Evidence from modern and ancient DNA. *PNAS*, 103:8113-8118.
- Benedé S., Blázquez A. B., Chiang D., Tordesillas L., Berin M. C. (2016). The rise of food allergy: environmental factors and emerging treatments. *EBioMedicine* 7, 27–34
- Boissieu D., Dupont C. (2002) Allergy to extensively hydrolyzed cow's milk proteins in infants: Safety and duration of amino acid–based formula. *The Journal of Pediatrics*. Volume 141, Issue 2, Pages 271-273
- Boyce J., Bochner B., Finkelman F., Rothenberg M. (2012) Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2011. *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology*. Volume 129, Issue 2, Pages 335–341
- Boyce, J. A., Assa'ad, A., Burks, A. W., Jones, S. M., Sampson, H. A., ... Schwaninger, J. M. (2010). Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 126(6 Suppl), S1–S58. doi:10.1016/j.jaci.2010.10.007
- Brumini, D., Criscione, A., Bordonaro, S., & Vegarud, G. E. (2016). Whey proteins and their antimicrobial properties in donkey milk: a brief review. *Dairy Science & Technology*, Volume 96, Issue 1, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13594-015-0246-1>
- Brumini, D., Furlund, C. B., Comi, I., Devold, T. G., Marletta, D., Vegarud, G. E., & Jonassen, C. M. (2013). Antiviral activity of donkey milk protein fractions on echo-virus type 5. *International Dairy Journal*, 28(2), 109–111. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.08.010>.

- Cao S., Feehley T. J., Nagler C. R. (2014). The role of commensal bacteria in the regulation of sensitization to food allergens. *FEBS Letters* 588, 4258–4266
- Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G. (2000) Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clinical & Experimental Allergy*, 30: 1597–1603.
- Chen, C.C., Chen, K.J., Kong, M.S., Chang, H.J., Huang, J.L. (2016). Alterations in the gut microbiotas of children with food sensitization in early life. *Pediatric Allergy and Immunology* 27, 254–262
- Chiofalo, B. and Salimei, E. (2001). Ass's milk: Exploitation of an alimentary resource. *Folium*, 3, pp. 235-41.
- Chiofalo, B., Polidori, P., & Vincenzetti, S. (2015). Milk Production and Characteristics of the Milk of the Jenny, Current Donkey Production and Functionality, Editors: Juan Vicente Delgado Bermejo and Francisco Javier Navas Gonzales. Chapter 5, pp.1-11
- Cianferoni, A., Muraro, A.. (2012) Food-induced anaphylaxis. *Immunology and Allergy' Clinics of North America.*; 32(1): 165-95. <https://doi.org/10.1016/j.iac.2011.10.002> PMID: 22244239 PMCID: PMC3440177
- Conti, A. et al. (2007). «Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: An in vivo and in vitro study». *Pediatric Allergy and Immunology* 18 (3). DOI 10.1111/j.1399-3038.2007.00521.x.
- Crittenden, R.G. and Bennett, LE. (2005): Cow's milk allergy: a complex disorder. *Journal of the American College of Nutrition*, 24(6 Suppl), pp. 582S-91S.
- D'Alessandro, A.G., De Petro, R.D.P., Claps, S., Pizzillo, M., Martemucci, G. (2010) Yield and quality of milk and udder health in Martina Franca ass: effects of daily interval and time of machine milking. *Italian Journal of Animal Science*, 8(2s), 697–699.
- D'Auria, E., Mamelì, C., Piras, C., Cococcioni, L., Urbani, A., Vincenzo, G., Roncada, P. (2018). Precision medicine in cow's milk allergy: proteomics perspectives from allergens to patients. *Journal of Proteomics*, 188, 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.01.018>
- Del Giudice, M. M., D'Auria, E., Peroni, D., Palazzo, S., Radaelli, G., Comberiati, P., ... Riva, E. (2015). Flavor, relative palatability and components of cow's milk hydrolysed formulas and amino acid-based formula. *Italian Journal of Pediatrics*, 41(1), 42. <http://dx.doi.org/10.1186/s13052-015-0141-7>.
- Dunlop J.H., Keet C. (2018). Epidemiology of Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38(1):13-25.
- Ebisawa, M., Ikematsu, K., Imai, T., Tachimoto, H. (2003) Food allergy in Japan. *Allergy & Clinical Immunology International - Journal of the World Allergy Organization* 15(05):214-217
- Eingenmann P.A. (2003). Future therapeutic options in food allergy. *Allergy*, 58: 1217–1223
- Fenaille F., Parisod V., Tabet J.C., Guy P.A. (2005). Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions. *Proteomics*, 5(12):3097-104.
- Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., & Bahna, S. L. (2010). Pautas de la Organización Mundial sobre Alergia [World Allergy Organization] (WAO) “ Organización Mundial sobre Alergia ” para el [Diagnostic and Rationale for Action against Cow ' s Milk Allergy] (DRACMA) “ Diagnóstico y Fundamento de la Acción Contra la Alergia a la Leche de Vaca ,” 3(21), 1–125. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01068.x>

- Flom, J. D., & Sicherer, S. H. (2019). Epidemiology of Cow's Milk Allergy. *Nutrients*; 11(5): 1051.
- Gubić, J., Tomić, J., Torbica, A., Iličić, M., Tasić, T., Šarić L., Popović S. (2016). Characterization of several milk proteins in domestic balkan donkey breed during lactation, using lab-on-a-chip capillary electrophoresis. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 22 (1) 9–15
- Gupta R., Springston E., Warriar M., Smith B., Kumar R., Pongracic J., Jane L. (2011) The Prevalence, Severity, and Distribution of Childhood Food Allergy in the United States. *Pediatrics*; Volume 128.
- Hipócrates. *Tratados hipocráticos. Obra completa.* Madrid: Editorial Gredos
- Host, A. Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2002, 89, 33–37.
- Iacono, G., Carroccio, A., Cavataio, F., Montalto, G., Soresi, M., Balsamo, V. (1992) Use of ass's milk in multiple food allergy. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 14:177–181. 34.
- ISAAC (2006). Phase three Study Group. Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. *Lancet*, 368:733-743.
- Jansen, P.R., Petrus, N.C.M., Venema, A., Posthuma, D., Mannens, M., Sprickelman, A.B., Henneman, P. (2018) Higher polygenetic predisposition for asthma in cow's milk allergic children. *Nutrients*, 10, 1582.
- Jehangir, A., Bennett, K., Fareedy, S. B., Rettew, A., Shaikh, B., Qureshi, A., ... Alweis, R. (2015). Recurrent C. difficile in a Patient with IgG Deficiency. *Case reports in gastrointestinal medicine*, 2015, 356293. doi:10.1155/2015/356293
- Jo, J., Garsen, J., Knippels, L., Sandalova, E. (2014). Role of cellular immunity in cow's milk allergy. Pathogenesis, tolerance induction, and beyond. *Mediators of Inflammation* 249784.
- Keet, C.A., Savage, J.H., Seopaul, S., et al. (2014) Temporal trends and racial/ethnic disparity in self-reported pediatric food allergy in United States. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*;112(3):222-9.e3
- LeFevre, A., Shillcutt, S.D., Saha, S.K., Ahmed A.S., Ahmed, S., Chowdhury, M.A, (2010) Cost-effectiveness of skin-barrier-enhancing emollients among preterm infants in Bangladesh. *Bull World Health Organ*; 88:104-12.
- Lifschitz, C., & Szajewska, H. (2015). Cow's milk allergy : evidence-based diagnosis and management for the practitioner, *European Journal of Pediatrics*, 174(2):141-50. doi: 10.1007/s00431-014-2422-3
- Ling, Z., Li Z., Liu X., Cheng Y., Luo Y., Tong X., et al. (2014). Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Applied and Environmental Microbiology*; 80:2546–2554. doi: 10.1128/AEM.00003-14.
- Linnaeus, C., (1758). *Tomus I. Systema naturae per regna tria naturae, secundum classes, ordines, genera, species, cum characteribus, differentiis, synonymis, locis. Editio decima, reformata.* Holmiae. (Laurentii Salvii) [1–4]:1–824
- Marletta, D., Tidona, F., & Bordonaro, S. (2016). Donkey milk proteins: Digestibility and nutritional significance. Milk proteins - from structure to biological properties and health aspects. Edited by Isabel Gigli. InTech <http://dx.doi.org/10.5772/62597>.

- Martin C., Ling P., Blackburn G. (2016). Review of Infant Feeding: Key Features of Breast Milk and Infant Formula. *Nutrients*, 8, 279
- Massouras, T., Triantaphyllopoulos, K. A., & Theodossiou, I. (2017). Chemical composition, protein fraction and fatty acid profile of donkey milk during lactation. *International Dairy Journal*, 75, 83–90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2017.06.007>.
- Mehaudy R., Parisi C.A.S., Petriz N., et al. (2018) Prevalencia de alergia a la proteína de la leche de vaca en niños, en un hospital universitario de comunidad. *Archivos Argentinos de Pediatría*, 116(3):219-223.
- Monti, G., Bertino, E., Mc, M., Coscia, A., Cresi, F., Silvestro, L., ... Fabris, C. (2007). Pediatric allergy and Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children : An in vivo and in vitro study. *Pediatric Allergy and Immunology*, 18(3):258-64. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2006.00521.x>
- Monti, G., Viola, S., Baro, C., Cresi, F., Tovo, P. A., Moro, G., ... Bertino, E. (2012). Tolerability of donkey's milk in 92 highly-problematic cow's milk allergic children. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 26, 75–82.
- Mori, F., Sarti, L., Barni, S., Pucci, N., Belli, F., Stagi, S., & Novembre, E. (2017). Donkey's milk is well accepted and tolerated by infants with cow's milk food protein-induced enterocolitis syndrome: A preliminary study. *Journal of Investigational Allergology & Clinical*, 27(4):269-271. doi: 10.18176/jiaci.0167.
- Mundial, O., & Salud, D. (2009). Razones médicas aceptables para el uso de sucedáneos de leche materna.
- Noval Rivas, M., Crother, T.R., Arditi. M. (2016). The microbiome in asthma. *Current Opinion in Pediatrics*; 6:764-771.
- Organización Mundial de la Salud (2005). Technical updates of the guidelines on Integrated Management of Childhood Illness (IMCI). Evidence and recommendations for further adaptations. [Actualizaciones técnicas de las normas de Atención Integrada de las Enfermedades Prevalentes de la Infancia (AIEPI). Pruebas científicas y recomendaciones para adaptaciones ulteriores.] Ginebra.
- Organización Mundial de la Salud (2007). Evidence on the long-term effects of breastfeeding: systematic reviews and meta-analyses. [Pruebas científicas sobre los efectos a largo plazo de la lactancia materna: exámenes sistemáticos y meta-análisis.] Ginebra.
- Osborne, N.J., Koplin, J.J., Martin, P.E., et al. (2011). Prevalence of challenge-proven IgE- mediated food allergy using population-based sampling and predetermined challenge criteria in infants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*; 127(3):668–76. e1-2.
- Piovesana, S., Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Barbera, G. La, Samperi, R., Chiozzi, R. Z., y Laganà, A. (2015). Peptidome characterization and bioactivity analysis of donkey milk. *Journal of Proteomics*, 119:21-9. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.01.020>
- Polidori, P., Vincenzetti, S., (2012) Protein profile characterization of donkey milk. Editor: Hurley WL. Milk Protein. In Tech; Rijeka, Croatia. p. 215–232. DOI: 10.5772/45982. ISBN 978-953-51-0743-9.
- Polidori, P., Ariani, A., & Vincenzetti, S. (2015). Use of donkey milk in cases of Cow's milk protein allergies. *International Journal*, 4(3), 175. <http://dx.doi.org/10.3390/foods2020151>.

- Ragona, G., Corrias, F., Benedetti, M., Paladini, I., Salari, F., Altomonte, I., & Martini, M. (2016). Amiata donkey milk chain : animal health evaluation and milk quality. *Italian journal of food safety*, 5, 1–6. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5951>
- Renz, H., Allen, K. J., Sicherer, S. H., Sampson, H. A., & Lack, G. (2018). Food allergy. *Nature Reviews Disease Primers* volume 4, Article number: 17098 <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.98>
- Renz, H., Brandtzaeg, P. & Hornef, M. (2011).The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*. 12, 9–23.
- Restani P. (2004). Goat milk allergenicity. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 39(4): 323-4.
- Robbins K.A., Wood R.A., Keet C.A. (2014) Milk allergy is associated with decreased growth in US children. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134, 1466–1468.
- Roth-Walter F., Berin M.C., Arnaboldi P., Escalante C.R., Dahan S., Rauch J., Jensen-Jarolim E., Mayer L. (2008). Pasteurization of milk proteins promotes allergic sensitization by enhancing uptake through Peyer’s patches. *Allergy*, 63(7):882-90. doi: 10.1111/j.1398-9995.2008.01673.x.
- Salimei, E., & Fantuz, F. (2012). Equid milk for human consumption. *International Dairy Journal*, 24(2), 130–142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2011.11.008>.
- Sampson H. (2004). Update on food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Volume 113, Issue 5, Pages 805-819
- Savage J., Johns C. (2015). Food Allergy, Epidemiology and Natural History. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, volume 35, Issue 1, Pages 45–59
- Scafizzari M, Giannico F, Potere O, Trani A, Colonna MA, Zezza L, Vonghia G, Caputi Jambregghi A (2009) Epidermal growth factor (EGF) in mare and ass milk: a preliminary investigation. *Italian Journal of Animal Science* 8(Suppl 2):737
- Schoemaker AA, Sprickelman AB, Grimshaw KE, et al. (2015) Incidence and natural history of challenge-proven cow’s milk allergy in European children–EuroPrevall birth cohort. *Allergy*, 70(8):963–72.
- Skibieli A., Downing L., Orr T., Hood W. (2013). The evolution of the nutrient composition of mammalian milks. *Journal of Animal Ecology*, 82, 1254–1264
- Souroullas, K., Aspri, M., & Papademas, P. (2018). Donkey milk as a supplement in infant formula : Benefits and technological challenges. *Food Research International*, 109, 416–425. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.051>
- Stintzing, G. and Zetterstrom, R. (1979): Cow’s milk allergy, incidence and pathogenetic role of early exposure to cow’s milk formula. *Acta Paediatrica Scandinavian*, 68, pp. 383-7.
- Swar, M. O. (2011). Donkey milk-based formula : A substitute for patients with cow’s milk protein allergy. *Sudanese Journal of Pediatrics*, 11(2), 21–24.
- Tafaro, A., Magrone, T., Jirillo, F., Martemucci, G., D’Alessandro, A.G., Amati, L. and Jirillo, E. (2007). Immunological properties of donkey’s milk: its potential use in the prevention of atherosclerosis. *Current Pharmaceutical Design*, 13, pp. 3711-17.
- Trinchese, G., Cavaliere, G., Berni, R., Matamoros, S., Bergamo, P., Filippo, C. De, ... Pina, M. (2015). Human, donkey and cow milk differently affects energy efficiency and inflammatory state by

modulating mitochondrial function and gut microbiota. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(11), 1136–1146. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.05.003>

Tsai H.J., Kumar R., Pongracic J., Liu X., Story R., Yu Y., Caruso D., Costello J., Schroeder A., Fang Y., (2009) Familial aggregation of food allergy and sensitization to food allergens: A family-based study. *Clinical & Experimental Allergy*, 39, 101–109

Tulleken, C. Van. (2018). Overdiagnosis and industry influence: how cow's milk protein allergy is extending the reach of infant formula. *BMJ* 5056, 1–5. <https://doi.org/10.1136/bmj.k5056>

Valle E., Raspa, F., Giribaldi, M., et al. (2017) A functional approach to the body condition assessment of lactating donkeys as a tool for welfare evaluation. *PeerJ* 5:e3001. doi: 10.7717/peerj.3001

Venter C., Arshad S.H. (2011). Epidemiology of food allergy. *Pediatric Clinics of North America*, 58(2):327-49, ix. doi: 10.1016/j.pcl.2011.02.011.

Vincenzetti S., Foghini L., Pucciarelli S., Polzonetti V., Cammertoni N., Beghelli D., Polidori P. (2014). Hypoallergenic properties of donkey's milk: a preliminary study. *Veterinaria Italiana* 50(2):99-107. doi: 10.12834/VetIt.219.125.5.

Vincenzetti, S., Amici, A., Pucciarelli, S., Vita, A., Micozzi, D., Carpi, F. M., ... Polidori, P. (2012). A proteomic study on donkey milk. *Biochemistry and Analytical Biochemistry*, 1(2), 1–8. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1009.1000109>.

Vita, D., Passalacqua, G., Di Pasquale, G., Caminiti, L., Crisafulli, G., Rulli, I., & Pajno, G. B. (2007). Ass's milk in children with atopic dermatitis and cow's milk allergy: Crossover comparison with

goat's milk. *Pediatric Allergy and Immunology*, 18(7), 594–598. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3038.2007.00567.x>.

Werfel T., Ahlers G., Schmidt P., Boeker M., Kapp A., Neumann C. (1997) Milk-responsive atopic dermatitis is associated with a casein-specific lymphocyte response in adolescent and adult patients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 99(1 Pt 1):124-33.

Yvon, S., Olier, M., Leveque, M., Jard, G., Tormo, H., Ali, D., ... Eutamène, H. (2018). Donkey milk consumption exerts anti-inflammatory properties by normalizing antimicrobial peptides levels in Paneth's cells in a model of ileitis in mice. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 155–166. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1304-z>

Zeng S. y Losinno L. (2017). Proceedings of the international symposium on donkey science.