



UNIVERSIDAD DE MURCIA
FACULTAD DE VETERINARIA

Fórmulas Infantiles Hipoalergénicas con Alto Grado de Hidrólisis Proteica y elevado Contenido de Ácidos Grasos Poliinsaturados de Cadena Larga para la Prevención Terciaria en Lactantes con Alergia a las Proteínas de la Leche de Vaca

D^a. Esther Matencio Hilla

2013

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	7
ÍNDICE DE TABLAS	11
ABREVIATURAS.....	17
INTRODUCCIÓN.....	23
OBJETIVOS	27
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	31
Inmunidad del lactante	33
<i>Sistema inmunitario humano</i>	33
<i>Sistema inmunitario en el lactante</i>	39
<i>Factores sensibilizantes en la infancia en niños atópicos</i>	40
Alergias e intolerancias	44
<i>Marcha atópica</i>	47
<i>Alergias alimentarias</i>	49
Alergia a las proteínas de la leche de vaca.....	55
<i>Fisiopatología y prevalencia de la APLV</i>	60
<i>Diagnóstico de la APLV</i>	63
<i>Tratamiento Nutricional de la APLV/IPLV</i>	67
<i>Prevención de la APLV</i>	73
<i>Tolerancia</i>	74
Validación de fórmulas terapéuticas.....	78
<i>Caracterización fisico-química del producto</i>	78
<i>Evaluación Nutricional</i>	87
<i>Evaluación de antigenicidad</i>	95
Biomarcadores de alergia e inflamación	99
Nuevas estrategias en la prevención y tratamiento de alergias. Ingredientes funcionales.....	104
<i>AGPI-CL ω-6/ω-3</i>	107
<i>Peptidos bioactivos</i>	110

MATERIALES Y METODOS	113
Diseño Experimental.....	115
Experimento 1. Caracterización antigénica y nutricional de la fórmula.....	117
Caracterización antigénica y nutricional de los hidrolizados.....	117
<i>Caracterización antigénica y nutricional de la nueva fórmula</i>	130
c) Identificación de Péptidos Bioactivos en la fórmula.....	134
d) Ensayo clínico con lactantes con APLV.....	136
Experimento 2. Estatus Nutricional de los AGPI-CL ω -3 y ω -6.....	148
Toma de muestras en los centros hospitalarios.....	148
Análisis de los AGPI-CL en la membrana de los eritrocitos.....	149
Experimento 3. Biomarcadores de tolerancia antigénica.....	151
Determinación de citocinas en plasma.....	151
Análisis estadístico de los resultados.....	153
<i>Análisis estadístico de la calidad proteica</i>	153
<i>Análisis estadístico del contenido de proteína inmunoreactiva</i>	153
<i>Análisis estadístico del ensayo clínico</i>	153
RESULTADOS	155
Experimento 1. Caracterización antigénica y nutricional de la fórmula.....	157
<i>Caracterización antigénica y nutricional de los hidrolizados</i>	157
<i>Caracterización antigénica y nutricional de la nueva fórmula</i>	160
<i>Identificación de péptidos bioactivos en la fórmula</i>	161
<i>Ensayo clínico con lactantes con APLV</i>	167
Experimento 2. Estatus nutricional de los AGPI-CL ω -3 y ω -6.....	182
Experimento 3. Biomarcadores de tolerancia antigénica.....	184
DISCUSIÓN	189
Caracterización antigénica y nutricional de la fórmula.....	192
<i>Caracterización de los hidrolizados y la fórmula terapéutica</i>	193

<i>Identificación de péptidos bioactivos en la fórmula terapéutica</i>	196
<i>Caracterización antigénica y nutricional de los hidrolizados in vivo</i>	200
<i>Ensayo clínico con lactantes con APLV</i>	204
Estatus nutricional de los AGPI-CL ω -3 y ω -6	220
<i>Lactancia materna, lactancia artificial y AGPI-CL</i>	221
<i>Marcadores biológicos de los ácidos grasos procedentes de la dieta</i>	222
<i>AGPI-CL y alimentación complementaria</i>	224
Biomarcadores de tolerancia antigénica	226
CONCLUSIONES	235
RESUMEN	241
SUMMARY	247
BIBLIOGRAFÍA	253

ÍNDICE DE FIGURAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Figura 1. Respuesta del sistema inmunológico ante un antígeno.....	34
Figura 2. Diferenciación en citocinas T_{H1} y T_{H2}	36
Figura 3. Mecanismo de presentación de antígenos a células T_{H0} y activación de patrones de citocinas.....	38
Figura 4. Esquema de la Immunoprogramación.....	40
Figura 5. Factores sensibilizantes.....	43
Figura 6. Esquema de Hipersensibilidad.....	45
Figura 7. Enfermedades reconocidas como atópicas.....	47
Figura 8. Esquema de la marcha atópica. Prevalencia de los distintos tipos de alergia en función de la edad.....	48
Figura 9. Árbol de decisiones para la elección de una dieta antes del test de provocación.	55
Figura 10. Estructura de la β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina.....	57
Figura 11. Estructura de las caseínas.....	59
Figura 12. Algoritmos para el diagnóstico y manejo de la APLV moderada y severa cuando fueron alimentados con fórmulas artificiales.....	64
Figura 13. Mecanismo de reacción alérgica a las PLV.....	75
Figura 14. Esquema de los ensayos para la validación de fórmulas hipoalérgicas.....	78
Figura 15. Modulación de la respuesta $TH1/TH2$ a través de $TGF-\beta$ presente en la leche materna.....	101
Figura 16. Modelo propuesto para el desarrollo de $IL17$ durante la inflamación alérgica.....	102
Figura 17. Hipótesis sobre la aparición de las alergias.....	105
Figura 18. Ingredientes Funcionales. Nuevas tendencias en la prevención de enfermedades alérgicas.....	107

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 19. Plan de trabajo.....	115
Figura 20. Cronograma del plan de trabajo.....	116
Figura 21. Grupos de investigación implicados en el estudio.....	116
Figura 22. Esquema procedimiento para la determinación de caseína bovina.....	120
Figura 23. Diseño experimental.....	124
Figura 24. Recipientes para la recogida de orina y heces.....	125
Figura 25. Diseño experimental de la prueba de anafilaxia.....	129

RESULTADOS

Figura 26. Origen proteico y proporción de péptidos (PM<1000 Da) en la fórmula terapéutica - HPLC-MS.....	162
Figura 27. Reclutamiento y seguimiento de lactantes con APLV durante el periodo de seguimiento de 3 meses.....	168
Figura 28. Tipo de alimentación desde el nacimiento hasta la inclusión en el estudio.....	169
Figura 29. Alimentación complementaria hasta la inclusión.....	170
Figura 30. Descripción de los síntomas y signos antes de la inclusión.....	171
Figura 31. Resultados obtenidos en la prueba cutánea.....	172
Figura 32. Resultados obtenidos en la determinación de IgE específica en suero.....	172
Figura 33. Consistencia de las heces.....	175
Figura 34a. Evolución del peso-talla en cada visita del estudio según percentiles de las Tablas de crecimiento de la FAO-WHO. Sexo Masculino.....	177
Figura 34b. Evolución del peso-talla en cada visita del estudio según percentiles de las Tablas de crecimiento de la FAO-WHO. Sexo Femenino.....	178
Figura 34c. Desviaciones estándar en peso, talla y perímetro cefálico en cada visita del estudio. Masculino.....	178
Figura 34d. Desviaciones estándar en peso, talla y perímetro cefálico en cada visita del estudio. Sexo Masculino.....	179
Figura 35. Porcentaje de DHA y AA del total de ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos.....	183
Figura 36. Porcentaje de LA y LNA en la membrana de los eritrocitos.....	184
Figura 37. Niveles de citocinas en plasma, de lactantes con APLV, antes y después del seguimiento. Mediana, valor máximo, valor mínimo.....	187

ÍNDICE DE TABLAS

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Tabla 1. Factores de Riesgo de sensibilización debido a hábitos durante el embarazo.	41
Tabla 2. Principales alérgenos en la infancia	52
Tabla 3. Proteínas de la leche de vaca	57
Tabla 4. Porcentaje de homologías de proteínas lácteas de mamíferos con las proteínas de la leche de vaca.....	60
Tabla 5. Nuevos estudios diagnósticos.....	67
Tabla 6. Recomendaciones de distintos organismos para el tratamiento de la APLV.....	69
Tabla 7. Recomendaciones de la guía DRACMA para la correcta elección de una fórmula cuando no es posible la lactancia materna.....	70
Tabla 8. Fórmulas comercializadas en España para el tratamiento de la APLV y atopías	72
Tabla 9. Recomendaciones para la prevención.....	73
Tabla 10. Composición básica de los preparados para lactantes (Dir 2006/141/CE)	79
Tabla 11. Parámetros nutricionales a evaluar en una fórmula en la planificación de una dieta especial para el tratamiento de APLV.....	80
Tabla 12. Contenido proteico en fórmulas hidrolizadas terapéuticas.....	81
Tabla 13. Relación caseína: suero en fórmulas extensamente hidrolizadas.....	88
Tabla 14. Valores normalizados de la Bioquímica del estado nutricional de 1 a 12 meses de edad.....	94
Tabla 14 Continuación. Valores normalizados de la Bioquímica del estado nutricional de 1 a 12 meses de edad.....	95
Tabla 15. Marcadores de inflamación.....	103
Tabla 16a. Evidencias científicas de los AGPI-CL en la prevención y tratamiento.....	108
Tabla 16b. Evidencias científicas AGPI-CL en la prevención y tratamiento.....	109
Tabla 16c. Evidencias científicas AGPI-CL en la prevención y tratamiento.....	109
Tabla 17. Listado de algunos péptidos bioactivos encontrados tras la digestión <i>in vitro</i> de muestras de leche humana.....	110

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 18. Datos relevantes encontrados en las fichas técnicas.....	117
Tabla 19. Composición de la dieta durante el período de endógeno (g/100g).....	121
Tabla 20. Composición de las dietas durante el período fundamental. Dietas isocalóricas con un 12% de proteína, que diferían en la fuente de ésta proteína.....	122
Tabla 21. Corrector vitamínico.....	122

Tabla 22. Composición de los hidrolizados.....	123
Tabla 23. Dieta para cobayas.....	127
Tabla 24. Escala de respuesta.....	130
Tabla 25. Tabla Nutricional de la fórmula terapéutica.....	131
Tabla 26. Criterios de inclusión y exclusión.....	138
Tabla 27. Motivos de retirada del estudio.....	138
Tabla 28. Síntomas clínicos de la APLV.....	140
Tabla 29. Variables en las distintas visitas.....	142
Tabla 30. Evaluación de la relación consumo fórmula en estudio con la aparición de un acontecimiento adverso.....	144
Tabla 31. Gravedad de los acontecimientos adversos.....	144
Tabla 32. Casos en los que no se realiza la prueba de provocación oral.....	145
Tabla 33. Ejemplo formulario de alimentación en CRD del lactante.....	147
Tabla 34. Ejemplo formulario de episodios adversos en CRD del lactante.....	147
Tabla 35. Concentración mínima de citocinas detectable.	152

RESULTADOS

Tabla 36. Distribución de Pesos Moleculares en los hidrolizados.....	157
Tabla 37. Contenido en proteínas inmunoreactivas.....	157
Tabla 38. Índices de calidad proteica.....	158
Tabla 39. Resultados de la evaluación de anafilaxia sistémica en cobayas sensibilizadas por vía oral (Criterio de puntuación).....	160
Tabla 40. Parámetros relacionados con la reducción de antigenicidad de la fórmula terapéutica.....	161
Tabla 41. Péptidos identificados en la fórmula terapéutica - HPLC-MS.....	163
Tabla 41 Continuación. Péptidos identificados en la fórmula terapéutica - HPLC-MS.....	164
Tabla 42^a. Péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ACE.....	165
Tabla 42^b. Péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana, antiviral, antibacteriana, inmunomodulante....	166
Tabla 43. Antecedentes familiares del lactante.....	169
Tabla 44. Descripción de los días de lactancia materna, mixta y artificial.....	170
Tabla 45. Métodos para el diagnóstico durante el primer periodo de inclusión.....	171
Tabla 46. Episodios de reagudización durante periodo de seguimiento.....	173

Tabla 47. Listado de acontecimientos adversos durante el estudio.....	174
Tabla 48. Peso, talla y perímetro cefálico al iniciar el estudio.....	175
Tabla 49. Ganancia en peso, talla y perímetro cefálico respecto a visita basal durante el primer periodo de seguimiento.....	176
Tabla 50. Parámetros bioquímicos y hematológicos correspondientes a la visita basal y a los 3 meses de intervención.	180
Tabla 51. Porcentaje de DHA, AA, EPA, LA y LNA en la membrana de los eritrocitos de lactantes con APLV.....	182
Tabla 52. Porcentaje de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, ω -3 y W-6 en la membrana de los eritrocitos de lactantes con APLV.....	184
Tabla 53. Análisis de las principales citocinas en plasma de lactantes con APLV.....	185

ABREVIATURAS

AA Ácido araquidónico

AAF Fórmulas elementales

AAP American Academy of Pediatrics

ACE enzima convertidora de la angiotensina

ADN Ácido desoxiribonucléico

AEP Asociación Española de Pediatría

AESAN Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

AGPI-CL Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga,

AGs Ácidos grasos

AMP Adenosin monofosfato

ANOVA Análisis de varianza

AOAC Association of Official Agricultural Chemists

APCs Células presentadoras de antígenos

APLV Alergia a la proteína de la leche de vaca

AT α 1-antitripsina

BHT Butil-hidroxi-tolueno

BV Valor biológico

C Caseína

°C Grados centígrados

CDV Digestibilidad verdadera

CEIC comité ético de investigación clínica

CH Hidrolizado extenso de caseína

CLA Ácido lineleico conjugado

cm Centímetros

CMP Citosin monofosfato

CRD Cuaderno de recogida de datos

CRS Carga renal de solutos

DA Dermatitis atópica

Da Dalton

DBPCFC Ensayo clínico debe ser doble ciego, placebo-control y de provocación

DCs Células Dendríticas

DE Desviación estándar

DHA Ácido docosahexaenoico

DPA Ácido docosapentaenoico

DRACMA Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines

EAACI European Academy of Allergy Clinical and Immunology

ECP Proteína catiónica del eosinófilo

eHF Fórmulas extensamente Hidrolizadas

ELISA Ensayo inmunoabsorbente de unión a una enzima

EPA Ácido eicosapentaenoico

ESPACI European Society of Pediatric Allergy Clinical and Immunology

ESPGHAN European Society for Pediatric Gastroenterology Health and Nutrition

ESPGAN European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition

ETA Ácido eicosatetraenoico

ETE Ácido eicosatrienoico

FAO Organización de Agricultura y Alimentación

FOS Fructo-oligosacáridos

FPIES Food Protein Induced Enterocolitis Syndrome

GINI German Infant Nutrition Study

GMP Guanidin monofosfato

GOS Galacto-oligosacáridos

g Gramos

h horas

HPLC-MS Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a detector de masas

HSF Fórmulas de hidrolizados de soja

H₂SO₄ Ácido sulfúrico

IDACE European Dietetic Food Industry Association

IgA Inmunoglobulina A

IgE Inmunoglobulina E

IgG₄ Inmunoglobulina G₄

IPLV Intolerancia a las proteínas de la leche de vaca

IL-2 Interleucina 2

IL-4 Interleucina 4

IL-5 Interleucina 5

IL-6 Interleucina 6

IL-8 Interleucina 8

IL-10 Interleucina 10

IL-12 Interleucina 12

IL-17 Interleucina 17

INF-γ Interferón γ

Kg kilogramo

LA Ácido linoleico

LNA Ácido linolénico

LPS lipopolisacáridos

LV Leche de vaca

MALDI-TOF Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight.

MCTs Triglicéridos de cadena media

MgCl₂ Dicloruro de Magnesio

min Minutos

ml Mililitro

mm Milímetro

mm³ milímetros cúbicos

mOsm Miliosmol

m/z Relación masa-carga

NaCl Solución salina

NaHCO₃ Bicarbonato sódico

ND No detectado

NK Células Natural Killer

NPU Utilización neta de la proteína

NODs Receptores tipo NOD (Nucleotide binding oligomerization domains)

ORAC capacidad de absorción de radicales de oxígeno libres

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

PER Coeficiente de eficacia en crecimiento

pg picogramo

pHF Fórmulas parcialmente hidrolizadas

PLV Proteína de leche de vaca

PM Peso molecular

PPs Placas de peyer

psi Unidades de presión

sIgA Inmunoglobulina IgA secretora

RHF Fórmulas de hidrolizados de arroz

rpm Revoluciones por minuto

RNA_m Ácido ribonucleico mensajero

SEICAP Sociedad Española de Inmunología, Alergia y Asma Pediátrica

SCF Comité científico de nutrición de la comisión europea

SCIT Inducción de tolerancia cutánea

SDS-PAGE Electroforésis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico

SF Fórmulas de soja

SLIT Inmunotolerancia sublingual

SPT Test cutáneo de prick

SOTI Inducción de tolerancia oral específica

TCA Ácido tricloroacético

TGF-β Factor de crecimiento tipo β

T_{H0} Linfocitos tipo T cooperador o helper no diferenciados

T_{H1} Linfocitos tipo T cooperador o helper tipo 1, pro-inflamatorio

T_{H2} Linfocitos tipo T cooperador o helper tipo 2, pro-alérgicos

T_{H3} Linfocitos tipo T cooperador o helper tipo 3, reguladores

T_H17 Linfocitos T_H tipo 17, pro-inflamatorios

Treg Células T reguladoras

TLRs Receptores tipo Toll

TNF-α Factor de necrosis tumoral tipo α

μl Microlitro

μm Micrómetro

UMP Uridina 5 monofosfato

VCM Volumen corpuscular medio

W Suero proteico

WAO World Allergy Organization

WH Hidrolizado extenso de suero

WHO World Health Organization

% Porcentaje

Durante las últimas décadas se ha producido un aumento de las enfermedades alérgicas; de hecho el 30-40% de la población global se ve afectada por una o más alergias (WAO 2011) y en torno a un 4.9% de la población infantil sufre alergia a la proteína de la leche de vaca, durante el primer año de vida (Fiocchi et al., 2010). La "hipótesis de la higiene" fue propuesta por Strachan en 1989 (*Strachan, 1989*), para explicar el aumento de la prevalencia de enfermedades atópicas en la población. Strachan razonó que la exposición repetida a los microbios a una edad temprana, por ejemplo como resultado de tener hermanos, ser dueño de una mascota, vivir en una granja o asistir a guarderías, en realidad ayudaba a nuestros sistemas inmunológicos a adaptarse apropiadamente de modo que no reaccionaran con desmedida al estímulo ambiental, tal como a los alérgenos potenciales. Ésto sería una posible explicación al hecho de que las enfermedades por hipersensibilidad y autoinmunes tengan una incidencia mucho mayor en países desarrollados que en los subdesarrollados; al haber una higiene mayor en los primeros, se producen dichas enfermedades. La combinación de la "hipótesis de la higiene" junto con el desequilibrio en la respuesta T_H1/T_H2 sostiene la hipótesis de que un reducido contacto con microbios y la reducción de la carga de enfermedades infecciosas en la edad temprana, conducen a debilitar la respuesta inmunológica T_H1 y estimular la respuesta T_H2 (*Rautava et al., 2004*).

La elevada prevalencia de enfermedades atópicas en los países desarrollados, se justifica a través de la "hipótesis de la higiene", pero también existe una "hipótesis" relacionada con el consumo elevado de ácidos poliinsaturados de cadena larga ω -6 (*Dunder et al., 2001; Calder, 2006*); una tercera "hipótesis" relacionada con los cambios dietéticos experimentados en la sociedad occidental durante las últimas décadas (*Prescott, 2011*) y una cuarta "hipótesis" relacionada con la deficiencia de vitamina D en determinados grupos poblacionales (*Bozzetto et al., 2012*). Además las últimas investigaciones justifican la elevada prevalencia de alergias también, desde un punto de vista epigenético (*Prescott, 2011*). Concretamente esta "hipótesis epigenética" se fundamenta en el hecho de que antes del nacimiento y durante la infancia, existe una exposición a distintos alérgenos y contaminantes medioambientales, que pueden provocar metilaciones del ADN y acetilaciones de las histonas, cambios en la expresión de los genes, que a su vez, pueden ser

transgeneracionales. Esta predisposición y exposición comienza en el útero, continúa en el nacimiento y en la infancia; estos hechos hacen que se pueda hablar en el caso de las alergias, de una programación temprana evitable, pues el desarrollo del sistema inmunitario está siendo dirigido a través de los cambios ambientales a los que estamos expuestos.

Por estos motivos, parece necesario combatir la aparición de alergias desde la edad temprana e incluso durante la etapa uterina. De acuerdo a todos los datos epidemiológicos, observacionales y clínicos recientemente publicados, parece interesante estudiar la manera de contribuir a la prevención y tratamiento de alergias a edades tempranas y la prevención de la marcha atópica.

Durante las dos últimas décadas, son numerosos los estudios desarrollados en base a la prevención de enfermedades alérgicas mediante la utilización de ingredientes funcionales, tales como, DHA, prebióticos y probióticos. Recientemente también se ha demostrado la implicación de la vitamina D en el desarrollo del sistema inmunitario del lactante y su papel en la prevención de enfermedades atópicas.

En cuanto a la prevención terciaria de enfermedades alérgicas en la infancia, existe aún bastante controversia entre las recomendaciones emitidas por distintos organismos científicos. El retraso en la introducción de ciertos alimentos potencialmente alergénicos, ha sido una recomendación seguida durante varias décadas, sin embargo, hoy en día surge la hipótesis de la inducción de la tolerancia, a través de la introducción temprana de los alimentos potencialmente alergénicos, así como la utilización de ingredientes funcionales, capaces de modular o intervenir en el proceso educativo del sistema inmunitario del lactante alérgico (*Torres et al., 2012*).

La mejor estrategia para reducir el incremento de enfermedades alérgicas, es la prevención primaria, siendo actualmente, la prevención terciaria el caballo de batalla de pediatras, gastroenterólogos, nutricionistas y alergólogos. Nacemos con un genotipo y un programa epigenético para regular el sistema inmunitario, pero este programa es susceptible de modificaciones ambientales ya antes del nacimiento.

OBJETIVOS

Las enfermedades alérgicas han alcanzado proporciones tales que se considera ya una epidemia en todo el mundo y su incidencia sigue aumentando. Es por ello que la *Organización Mundial de la Salud (OMS)*, en unión de la *Organización Mundial de Alergias (WAO)*, han desarrollado un proyecto colaborativo denominado "*Prevención de Alergias y Asma Alérgica*", con el fin de establecer objetivos estratégicos en la Prevención y Control de Enfermedades Crónicas de la OMS. Debido al papel tan destacado que juegan los alimentos y la alimentación en las alergias y para conseguir este objetivo es fundamental la participación de las empresas alimentarias y asociaciones como *IDACE (European Dietetic Food Industry Association)*, quien establece estrategias y recomendaciones dentro del ámbito de la prevención de las alergias, en concreto de las alergias a las proteínas de la leche de vaca. En este sentido el Instituto de Nutrición Infantil Hero, desde su creación en 2002 ha definido una línea de investigación dirigida a la prevención y tratamiento de las mismas. Dentro de este contexto ha surgido este trabajo de investigación, cuyo principal objetivo pretenden contribuir a la *prevención y tratamiento* de la alergia a la proteína de la leche de vaca y su posible contribución al desarrollo de tolerancia a través de una estrategia alimenticia adecuada a las necesidades nutricionales e inmunológicas de los lactantes alérgicos. La presente Tesis Doctoral se plantea como un primer paso en el estudio de la prevención terciaria de la enfermedad.

Como **objetivo general** de este trabajo nos hemos planteado la validación e investigación aplicada de una fórmula terapéutica que, cumpliendo las exigencias de la *ESPGHAN (European Society for Pediatric Gastroenterology and Nutrition)*, tengan como ingredientes claves de acción funcional un elevado contenido en AGPI-CL, DHA y AA, así como una elevada hidrolización de la proteína de la leche de vaca, en la prevención terciaria de la enfermedad y la adquisición de la tolerancia a la proteína de leche de vaca como base de las fórmulas infantiles.

De manera concreta los **objetivos específicos** planteados en la presente Tesis Doctoral han sido los siguientes:

Objetivo 1. Estudiar la tolerancia y valor nutricional de una fórmula terapéutica altamente hidrolizada, diseñada para el tratamiento de lactantes con alergia a la proteína de la leche de vaca.

- Evaluación de la capacidad antigénica y nutricional de los hidrolizados de proteína de leche de vaca.
- Estudio de la capacidad antigénica y nutricional de la fórmula infantil.
- Identificación de la presencia de péptidos bioactivos en la fórmula.
- Ensayo clínico con lactantes alérgicos a la PLV (proteína de la leche de vaca).

Objetivo 2. Conocer el estatus nutricional de los AGPI-CL ω -3 y ω -6 administrados a través de la fórmula terapéutica.

- Análisis del contenido en AA y DHA en la membrana de los eritrocitos.

Objetivo 3. Estudiar el efecto de la administración de los AGPI-CL ω -3 y ω -6 en la prevención terciaria.

- Análisis del contenido de citocinas proinflamatorias, proalérgicas y reguladoras en plasma.
- Correlación del contenido de AA y DHA en la membrana de los eritrocitos con los niveles de citocinas.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Inmunidad del lactante

Sistema inmunitario humano

El sistema inmunitario humano permite distinguir entre las estructuras propias del organismo y las de otros sistemas biológicos extraños. El cuerpo humano tiene la capacidad de responder a millones de antígenos, componentes de naturaleza péptica que reconoce como no propios, desencadenando una respuesta inmune. Un antígeno es una macromolécula capaz de inducir una respuesta inmunitaria específica. Ante su presencia responden los linfocitos, capaces de reconocer específicamente determinadas estructuras moleculares antigénicas, denominadas epítomos. Por tanto, un antígeno debe contener epítomos como primera condición.

La inmunogenicidad es la capacidad que tienen los antígenos para inducir respuestas y la especificidad es la capacidad de reaccionar específicamente con anticuerpos. Un hapteno es una molécula que, por su pequeño tamaño, carece de inmunogenicidad pero por poseer epítomos dispone de especificidad. Un hapteno se puede conjugar con una proteína de suficiente tamaño, un carrier, y el conjunto se comporta como un antígeno capaz de inducir respuestas específicas frente al hapteno. Los antígenos son, mayoritariamente, proteínas que cumplen con una serie de requisitos: tamaño, complejidad estructural y presencia de epítomos. Los polisacáridos ramificados pueden ser antígenos, mientras que los lípidos no destacan por sus propiedades antigénicas.

La respuesta inmune se basa en el reconocimiento y la eliminación de las estructuras extrañas al organismo. Existen dos grandes niveles de reconocimiento de estas estructuras: el sistema inmunitario innato o natural y el sistema inmunitario adquirido o adaptativo.

El sistema inmunitario innato se caracteriza por ser la primera línea de defensa frente a las infecciones, se desarrolla antes de la exposición a agentes infecciosos, no tiene memoria y está constituido por:

- Células fagocíticas:
 - monocitos,
 - macrófagos,

- granulocitos,
- células natural killers (NKs).
- Barreras físicas como la piel y las membranas mucosales.
- Citocinas procedentes de macrófagos.

Las células fagocíticas son los principales efectores del sistema inmunitario innato; poseen en su superficie receptores específicos de elementos generalmente presentes en numerosos patógenos.

El sistema inmunitario adquirido se caracteriza por su alta especificidad. Las células que lo constituyen poseen en su superficie receptores específicos para un antígeno concreto. La activación de los receptores se produce durante varios días, pero una vez separado del antígeno da lugar a una memoria inmunológica, que le permitirá reaccionar de manera efectiva frente a una nueva exposición. El sistema inmunitario adquirido lo constituyen principalmente (Figura 1):

- Células de alta especificidad: linfocitos B, linfocitos T.
- Citocinas derivadas de linfocitos.
- Anticuerpos.
- El sistema inmunitario mucosal y cutáneo como barreras físicas.



Figura 1. Respuesta del sistema inmunológico ante un antígeno.

Los linfocitos B se caracterizan por su capacidad para producir anticuerpos, es decir inmunoglobulinas específicas para un antígeno concreto. Estas inmunoglobulinas actúan uniéndose a bacterias para impedir su adhesión a las células del huésped. También pueden activar las proteínas del sistema del complemento en el plasma, lo que conduce a la eliminación de la bacteria por fagocitosis. Estos fenómenos se relacionan con la inmunidad humoral (Figura 1).

Los linfocitos T actúan sobre aquellos patógenos que escapan a la respuesta humoral, presentando en su superficie receptores específicos de antígenos. Estas actuaciones constituyen la llamada inmunidad celular (Figura 1). La infección de una célula por patógenos a nivel intracelular se indica a los linfocitos T a través de la expresión de fragmentos peptídicos derivados de los patógenos, teniendo lugar en la superficie de la célula infectada. Esta unión es reconocida por los linfocitos T citotóxicos o supresores, $CD8^+$ T, procediendo a destruir a la célula infectada (Figura 1). Por su parte, los patógenos extracelulares estimulan una respuesta mediada T_H , consistente en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos del torrente sanguíneo hasta el lugar donde se encuentra el antígeno y la activación de los monocitos para eliminar dicho antígeno (*Calder, 2007*).

Los linfocitos T se clasifican de acuerdo a sus marcadores de superficie en células $CD4^+$ y $CD8^+$. Los linfocitos $CD4^+$ a su vez se dividen en dos tipos en función del patrón de citocinas liberadas. Así pues, T_H1 $CD4^+$ liberan IL-2, IFN- γ , TNF- α que a su vez activan a los macrófagos, células Natural Killer y linfocitos T citotóxicos (Figura 2). Por su parte, los linfocitos T_H2 $CD4^+$ secretan IL-4, IL-5, IL-6 y IL-10. Las células T_H2 facilitan la proliferación de células B y su diferenciación en anticuerpos. Las células T_H1 y T_H2 son células efectoras de memoria. Las células T_H3 secretan principalmente TGF- β y en menor grado IL-10, IL-4, mientras que las células T reguladoras secretan IL-10 y pequeñas cantidades de TGF- β (Figura 3) (*Spiekermann y Walker, 2001*). Los linfocitos T reguladores suprimen la inmunidad celular mediada y algunos procesos inflamatorios. Recientemente se ha descubierto a los linfocitos T_H17 , productores de la citocinas IL-17, implicada en procesos inflamatorios alérgicos. Estos linfocitos constituyen la tercera rama de linfocitos T $CD4^+$ de memoria y participan en la inflamación tisular y en la protección contra

patógenos extracelulares. La aparición de esta familia de citocinas procedentes de los linfocitos T_H17 conduce a la revisión del paradigma T_H1/T_H2 (Wang y Liu, 2008). Las células T_H no diferenciadas, dependiendo de la naturaleza del antígeno y de las citocinas presentadas, proceden a su diferenciación en células T_H1 o T_H2 . Cuando se presenta un antígeno intracelular producido por la fagocitosis de una bacteria, a la vez que se produce IL-12 por la célula presentadora de antígenos (APCs), las células T_H se diferencian en células T_H1 que producen IL-2. Ésta promueve la diferenciación de linfocitos T antígeno-específicos e IFN- γ , que activa a las células implicadas en la eliminación de la bacteria, virus, célula tumoral (Figura 2 y 3). Cuando las células T_H no diferenciadas son expuestas a antígenos extracelulares, estando además en presencia de IL-4, se produce la diferenciación en células T_H2 , las cuales generarán IL-4, IL-5 e IL-13, entre otras citocinas. IL-4 promueve la producción por las células B de IgE específicas que se unirán a los receptores de los mastocitos para producir la liberación del contenido de los mismos (Figura 2).

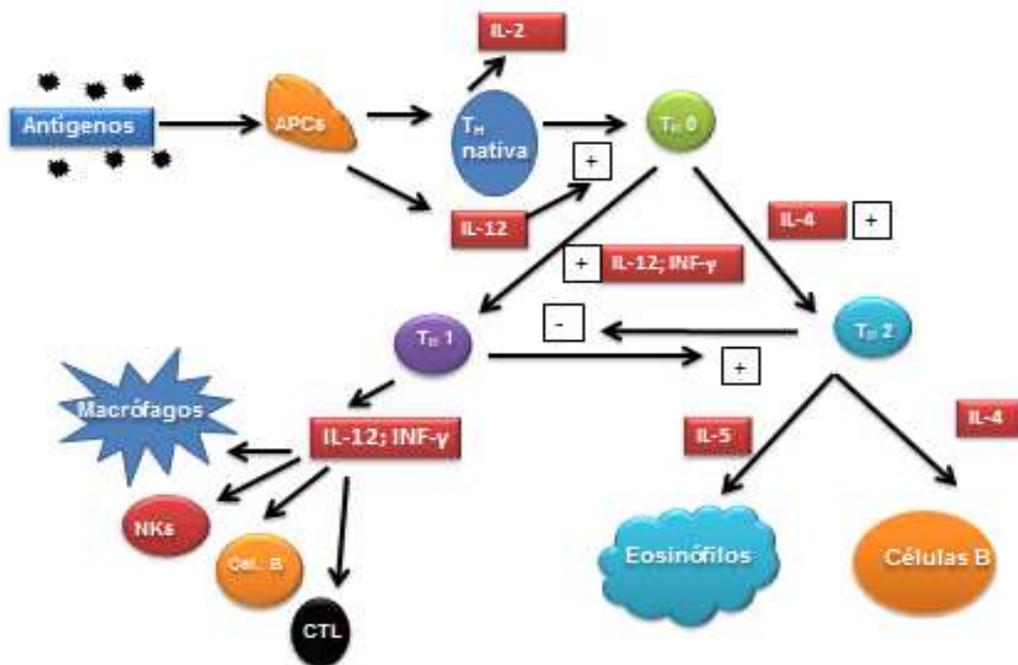


Figura 2. Diferenciación en citocinas T_H1 y T_H2 (Adaptada de Calder 2007)

La diferenciación en linfocitos T_H1 o T_H2 es lo que marca la respuesta a los diferentes tipos de infecciones. El último elemento en la regulación del equilibrio T_H1 y T_H2 es el IFN- γ , que inhibe la diferenciación en células T_H2 , y la IL-4 que a su vez inhibe la diferenciación y activación de las células T_H1 (Figura 2)(*Calder, 2007*). En ocasiones el balance T_H1/T_H2 se encuentra desequilibrado hacia una respuesta T_H1 o una respuesta T_H2 , debido a una predisposición genética y/o a la exposición a factores medioambientales. La respuesta T_H2 resultará en la producción de IgE específica, induciendo desgranulación de los mastocitos y activación de eosinófilos (Figura 2). La respuesta linfocitaria T_H3 se caracteriza por la secreción de citocinas IL-10 y TGF- β que producen una supresión activa de la respuesta inmunológica frente a antígenos. A esta reacción se le conoce como respuesta linfocitaria reguladora y es responsable del desarrollo de la tolerancia.

El sistema inmunitario adaptativo y el innato no funcionan independientemente el uno del otro, contribuyendo ambos al desarrollo de la tolerancia (*Thornton y Morgan, 2008*). Las células dendríticas (DCs) constituyen el enlace entre el sistema inmunitario adaptativo y el innato. Son células presentadoras de antígenos y se encuentran situadas en la lámina propia del intestino, en las placas de peyer (PPs) y en los folículos linfoides. Las células dendríticas y las células epiteliales intestinales, los enterocitos, reconocen estímulos procedentes de (alérgenos, lipopolisacáridos (LPS), péptidoglicanos, bacterias patógenas, bacterias comensales, flagelinas, fragmentos de ADN no metilados, etc.) en la luz intestinal a través de diversos receptores (receptores tipo Toll (TLRs), receptores tipo NOD (NODs)). Este reconocimiento activa en el enterocito una cascada de señales, que finalizan con la producción de citocinas proinflamatorias (*Artis, 2008*).

Las DCs del intestino están condicionadas por factores derivados de las células epiteliales intestinales y promueven la diferenciación de células T reguladoras y la migración de células B productoras de IgA hacia el nódulo mesentérico. Este proceso ocurre cuando las DCs muestrean bacterias comensales o tolerógenas. Un pequeño grupo de estas células escapan y dan lugar a una respuesta T_H17 o T_H1 y actúan como centinelas ante la presencia de bacterias patógenas. Sin embargo, cuando las DCs son expuestas a una invasión vírica, al igual que sucede con macrófagos y neutrófilos, son activadas por citocinas proinflamatorias y

componentes bacterianos y son reclutadas y activadas y conducen a una respuesta T_H1 (Coombes and Powrie, 2008).

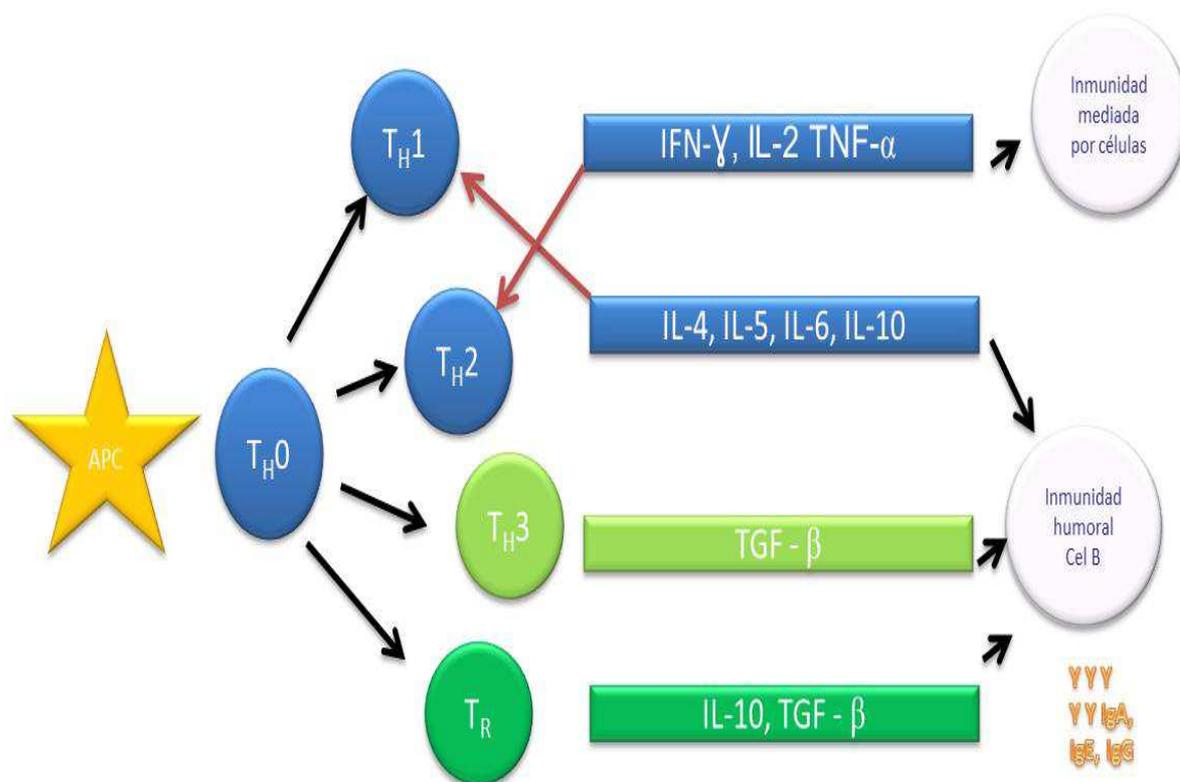


Figura 3. Mecanismo de presentación de antígenos a células T_H0 y activación de patrones de citocinas. (Adaptada de Spiekermann y Walker, 2001)

La interacción de la microbiota con las estructuras de la mucosa intestinal desempeña un papel decisivo en la formación y regulación del sistema inmunitario. La activación de los mecanismos de defensa naturales del huésped se basa en el rápido reconocimiento de patrones moleculares en los microorganismos por los receptores TLRs y NODs de las células presentadoras de antígeno. Este reconocimiento de los gérmenes determina una respuesta mediada bien por citocinas inflamatorias, si se trata de patógenos, o citocinas reguladoras, frente a bacterias comensales no patógenas. Las citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-12) inducen expansión clonal de células T, de fenotipo T_{H1} o T_{H2} , muy eficaces en el rechazo del patógeno, pero causan inflamación, lesión y pérdida de función en los tejidos propios. Por el contrario, las citocinas reguladoras (IL-10, TGF- β) favorecen la expansión clonal de células T reguladoras, que no rechazan al antígeno, ni causan

inflamación o pérdidas funcionales. El contexto de inmunotolerancia permite la exposición continua a una carga antigénica abrumadora (microbiota comensal, alimentos), sin que por ello se desencadenen reacciones inflamatorias que lesionarían al tejido intestinal propio (*Guarner et al, 2006*).

Sistema inmunitario en el lactante.

El recién nacido es un individuo inmunológicamente activo, con un sistema inmunitario inmaduro, carente de una respuesta inmune equilibrada y de una regulación inmune (*Björkstén, 2008*). Las barreras mucosales y epidérmicas que componen la primera línea de defensa innata, aparecen en la gestación temprana y maduran rápidamente durante el tercer trimestre de gestación, con el fin de proporcionar una adecuada protección a las pocas semanas del nacimiento; sin embargo, los macrófagos y las células NKs no alcanzan los niveles encontrados en adultos hasta la infancia tardía (*Palmer, 2011*). En cuanto al sistema inmunitario adaptativo, las células progenitoras de linfocitos están presentes en el timo desde la 8ª semana de gestación. Al nacer, desde un punto de vista cualitativo, el sistema inmunitario se ha completado pero existe retraso en la maduración de la defensa específica.

La programación del sistema inmunitario del lactante comienza durante la gestación. La madre gestante transfiere anticuerpos a través de la placenta y la madre lactante, a través de la leche materna, continuará transfiriendo al recién nacido numerosos componentes tales como citocinas, anticuerpos, hormonas, e incluso componentes nutricionales. Estos últimos pueden también conferir protección contra patógenos, como es el caso de los ácidos grasos de cadena larga (AGPI-CL), la lactoferrina, la lisozima, etc. (*Palmer, 2011*). El sistema inmunitario emergente es vulnerable, particularmente durante la etapa fetal temprana. Tanto el feto como el recién nacido requieren continuamente un *input*, desde la madre gestante, de factores inmunes a través de la placenta y la leche materna.

Durante el periodo de gestación, la madre gestante mantiene el desequilibrio del sistema inmunitario hacia una respuesta T_H2 . Sin embargo, este desequilibrio debe ser regulado hacia una respuesta linfocitaria T_H1 a través del contacto con microorganismos medioambientales durante el nacimiento, por vías vaginal y fecal,

por medio de la piel y la leche materna. Es crucial para el desarrollo de la inmunidad mucosal la colonización intestinal de los recién nacidos con bacterias dependientes de los contactos mencionados. Estudios epidemiológicos, clínicos y en animales, sugieren que una temprana exposición a las bacterias comensales está asociada con una protección contra alergias mediadas por IgE (Bjórstén, 2008).

En el inmunoprograma están implicados tanto el periodo prenatal como postnatal (Figura 4). La regulación de los patrones de respuesta inmune fetal y natal dependerán de la transmisión, desde la madre gestante y lactante, de anticuerpos, antígenos y otras células (Renz et al., 2008). Durante el periodo postnatal, la leche materna estimula las funciones físicas y químicas de la barrera intestinal y modula el sistema inmunitario hacia una respuesta T_H1 (Figura 4). Son varios los compuestos de la leche materna que estimulan estas funciones: oligosacáridos, lípidos precursores de leucotrienos, anticuerpos (Chirico et al, 2008).

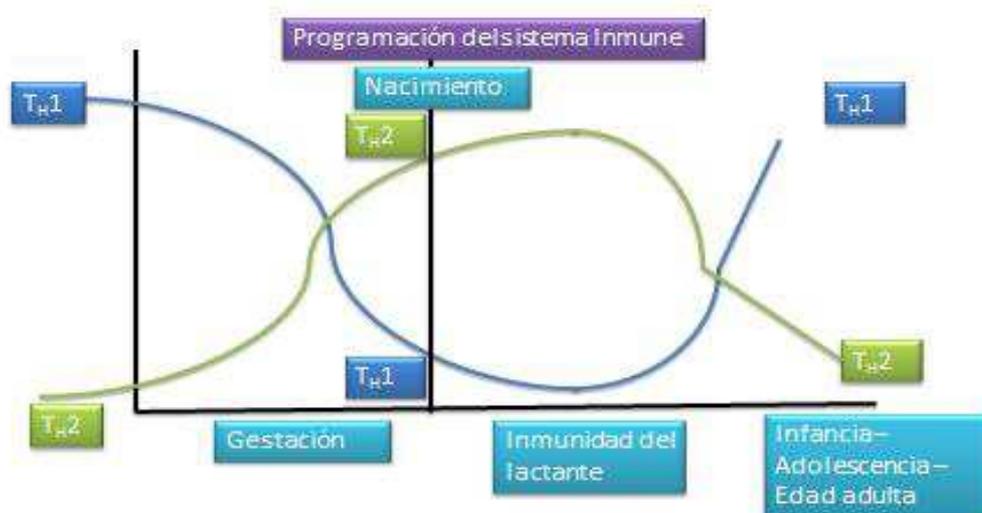


Figura 4. Esquema de la inmunoprogramación.

Factores sensibilizantes en la infancia en niños atópicos

Para comprender el origen de las alergias en la infancia temprana, es fundamental identificar los factores que contribuyen al desarrollo de una respuesta linfocitaria T_H2 hacia alérgenos. La sensibilización alérgica se debe a un fallo en el huésped para establecer una tolerancia inmunológica hacia antígenos no patogénicos

inhalados o ingeridos. La inmunotolerancia es un mecanismo mediante el cual se previene la auto-reactividad contra antígenos propios. En una situación de constante estimulación inmunológica, el mantenimiento de un equilibrio homeostático entre tolerancia e inmunidad supone un reto regulador único del sistema mucosal inmune (Gómez-Llorente et al., 2010).

En el lactante, la forma precoz de alimentarlo, así como la exposición diaria a alérgenos inhalantes y humo de tabaco, influyen en el desarrollo de alergias (Tormo y Martín, 2010). La existencia de carga atópica familiar y la introducción de pequeñas cantidades de leche de vaca, durante la lactancia natural, pueden ser consideradas, en algunos casos, como factores de riesgo (Wahn, 2008; von Berg et al., 2008). Son muchos los factores que pueden contribuir al perfil inmunológico del niño y al desarrollo de alergias durante la infancia o en la edad adulta (Tabla 1 y Figura 5) (Pali-Schöll et al., 2009).

Tabla 1. Factores de riesgo de sensibilización debido a hábitos durante el embarazo.

Autores	Hábitos	Riesgo asociado
Sausentaler et al., 2003; Devereux et al., 2005	Dieta rica en AGPI ω -6 durante la gestación	Aumenta el riesgo de eczema durante los 2 primeros años de vida
Willers et al., 2007	Consumo diario de frutos secos durante gestación	Aumenta el riesgo de sibilaciones, asma y uso de esteroides
Fitzsimon et al., 2007	Ingesta elevada de energía y lípidos	Aumenta el riesgo de sensibilización y asma
Kulig et al., 1994; Horak et al., 2007; Lanero et al., 2008	Exposición al humo de tabaco durante la gestación	Aumenta los niveles de IgE totales y específicos, eosinófilos, enfermedades respiratorias y sibilaciones
Linneberg et al., 2004	Consumo de alcohol	Aumenta los niveles de IgE
Renz et al., 2006	Insuficiente exposición a bacterias medioambientales	Desarrollo de enfermedades alérgicas, asma, IgE total elevada, fiebre del heno

Un grupo de investigadores de EEUU han demostrado como la deficiencia de vitamina D durante el embarazo podría ser la responsable del aumento de asma y alergia, como consecuencia de una reducida exposición solar, observando a su vez un aumento en la preinscripción de epinephrine (Camargo et al., 2007a). Este mismo grupo han comprobado como la ingesta de vitamina D por la madre reduce el riesgo de sibilaciones en niños de 3 años de edad (Camargo et al., 2007b).

También se ha observado que durante la gestación, un consumo excesivo de AGPI-CL ω -6, contenidos en margarinas y aceites vegetales, pueden inducir eczema en niños durante los dos primeros años de edad (*Sausentaler et al., 2007; Devereerux et al., 2005*).

Un estudio, donde se han reclutado madres gestantes fumadoras y no fumadoras, muestra como los niños nacidos de madres gestantes fumadoras durante el embarazo presentaban niveles de citocinas T_H2 mayores que los niños de madres no fumadoras (*Noakes et al., 2003*). Además, parece que la exposición al humo de tabaco, en niños nacidos de padres no alérgicos, durante los dos primeros años de vida es un riesgo de inducción de IgE contra aeroalérgenos y alérgenos alimenticios (*Lanero et al., 2008*).

El tratamiento con antibióticos durante los primeros 6 meses de edad también ha sido relacionada con el desarrollo de atopía entre los 6 a 7 años de edad (*Johnson et al., 2005*), ya que los antibióticos provocan una alteración de la microbiota intestinal comensal y una alteración del desarrollo del sistema inmunitario intestinal (*Levy, 2000*).

El nacimiento mediante cesárea también podría estar relacionado con el riesgo de sensibilización en los recién nacidos, debido a la ausencia de contacto con bacterias por parte del feto durante el parto (*Pistiner et al., 2008*). Un estudio observa una correlación entre sibilaciones y niveles de IgE específica hacia alimentos, durante los 2 primeros años de vida en niños nacidos por cesárea (*Negele et al., 2004*).



Figura 5. Factores sensibilizantes durante el embarazo y la lactancia.

En definitiva, las enfermedades atópicas son enfermedades multifactoriales, en las que existe una interacción entre los factores medioambientales y genéticos que influyen en la manifestación fenotípica de la enfermedad (*Torres et al., 2012; Prescott y Nowak-Wegrzyn, 2011*).

La función inmune en la edad temprana y la futura susceptibilidad alérgica, parece ser el resultado de una combinación del fenotipado materno, genotipo del lactante y la exposición ambiental en el útero, que afecta la expresión génica temprana. Cambios epigenéticos en la expresión de los genes en una generación pueden ser heredados en las siguientes generaciones, amplificando el riesgo de alergia hereditaria. La exposición medioambiental a factores sensibilizantes, conduce a modificaciones en la expresión de los genes y este efecto puede ser transgeneracional (*Prescott, 2011*). Agentes epigenéticos pueden también forzar efectos transgeneracionales; así pues, los aeroalérgenos, como el humo de tabaco, son asociados con la metilación de las histonas, efectos proinflamatorios e incluso impacto en las funciones de la placenta (*Prescott, 2011*). Esto significa que, aunque la exposición desaparezca, el efecto podría producirse debido a la exposición en generaciones anteriores (*Prescott, 2008*).

En humanos, de acuerdo con la "hipótesis de la higiene", se ha observado que un ambiente rural tiene efecto protector frente al desarrollo de alergias.

Concretamente, un grupo de investigadores han estudiado el mecanismo inmunológico que tiene lugar, demostrando como la descendencia de madres expuestas durante la gestación a un ambiente rural, desarrollaron células Treg distintas, cualitativa y cuantitativamente, respecto a la descendencia de madres no expuestas. De esta forma han demostrado como la exposición de madres gestantes podría influir positivamente en el desarrollo inmune del lactante y reducir las alergias. Las células Treg de niños nacidos de madres expuestas al ambiente rural se caracterizan por ser más eficientes y presentar niveles más bajos de citocinas T_H2 (Schaub et al., 2009).

Alergias e intolerancias

Las definiciones de atopía, enfermedad atópica y alergia han ido cambiando a lo largo de los años. En el año 2001, la *Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica, EAACI* en sus siglas inglesas, publicó un documento estándar sobre la nomenclatura relacionada con las enfermedades alérgicas (Figura 6). La posición de este organismo fue establecer el término de hipersensibilidad como paraguas de enfermedades mediadas y no mediadas por IgE, reservando el término de alergia para aquellas reacciones clínicas en los que claramente hay un mecanismo inmunológico implicado. El término atopía lo definió como la tendencia familiar o personal a desarrollar IgE específica a un alérgeno, tras la exposición a alérgenos medioambientales o sufrir síntomas típicos de alergia (Johansson et al., 2001).

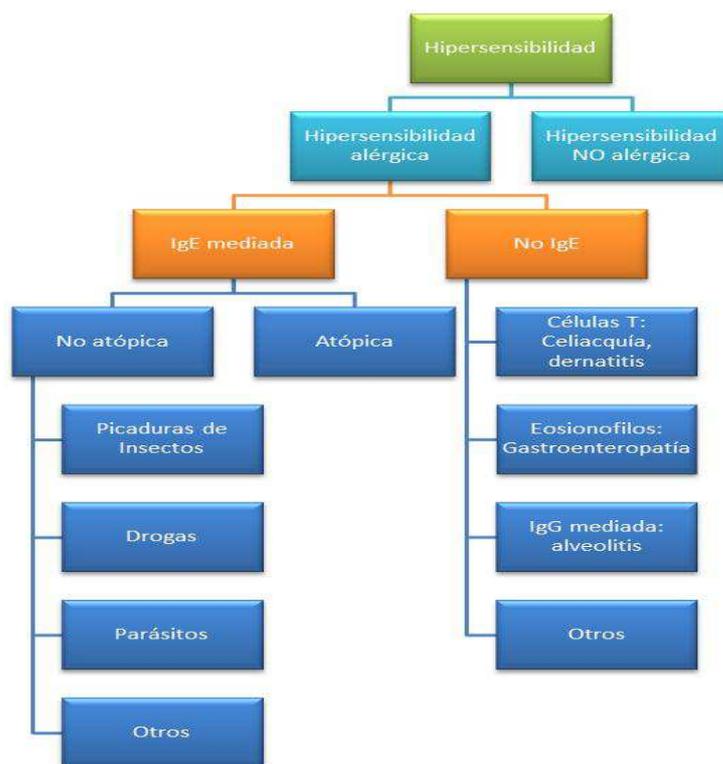


Figura 6. Esquema de Hipersensibilidad (adaptada desde Johansson et al., 2004)

Este informe, emitido por la *EAACI* en el año 2001, es de nuevo revisado en el año 2004 por la *Organización Mundial de Alergia, WAO* en sus siglas inglesas, estableciendo una nomenclatura globalmente aceptada para las enfermedades alérgicas. Algunos términos establecidos en este documento fueron los siguientes (*Johansson et al., 2004*):

- **Hipersensibilidad:** síntomas o señales objetivamente reproducibles iniciadas por la exposición a un estímulo definido en una dosis tolerada por personas normales.
- **Alergia:** reacción de hipersensibilidad iniciada por un mecanismo inmunológico específico.
- **Atopía:** tendencia personal y/o familiar, usualmente en niños y adolescentes, a sensibilizarse y producir anticuerpos IgE en respuesta a una exposición ordinaria de alérgenos, generalmente proteínas. Estos sujetos suelen desarrollar síntomas típicos de asma, rinoconjuntivitis o eczema.

- Alérgeno: antígeno causante de enfermedades alérgicas.
- Tipos de alergias: asma, rinitis, conjuntivitis, dermatitis, urticaria, hipersensibilidad a alimentos, hipersensibilidad a fármacos, hipersensibilidad a picaduras de insectos, anafilaxia.
- Hipersensibilidad alimentaria: alergia alimentaria es el término adecuado siempre que medie un mecanismo inmunológico. Si están implicados anticuerpos IgE en la reacción el término apropiado es alergia alimentaria mediada por IgE. El resto de reacciones serán referidas como hipersensibilidad alimentaria no alérgica.
- Anafilaxia: reacción de hipersensibilidad sistémica severa, que puede poner en peligro la vida. Cuando la anafilaxia es mediada por IgE hablamos de anafilaxia alérgica mediada por IgE. Cuando es causada por mecanismos no inmunológicos se denomina anafilaxia no alérgica.
- Dermatitis: inflamación local de la piel (eczema, dermatitis por contacto y otras formas de dermatitis). El eczema es un término que engloba varias enfermedades severas de la piel con características clínicas comunes, implicando un determinado defecto genético en la barrera cutánea (eczema atópico y eczema no atópico).
- Rinitis: síntomas de hipersensibilidad en la nariz (estornudos, aumento de secreciones, bloqueo, picazón). Puede ser de diversos tipos: rinitis alérgica mediada por IgE, rinitis alérgica estacional y rinitis no alérgica. A su vez la WAO propone clasificar la rinitis alérgica como intermitente o persistente en función de su duración y suave o moderada a severa según efectos de los síntomas en el trabajo, sueño y otras actividades.
- Conjuntivitis: conjuntivitis alérgica, si está mediada por IgE, y conjuntivitis no alérgica en otros casos. La conjuntivitis alérgica va acompañada generalmente de rinitis alérgica.

Las alergias son reacciones de hipersensibilidad mediadas por anticuerpos o por mecanismos celulares. En la mayoría de los pacientes con síntomas alérgicos de las membranas mucosales del tracto respiratorio o gastrointestinal, los anticuerpos son IgE y se dice entonces que estos pacientes sufren una alergia mediada por IgE (Johansson et al., 2004). La Academia Americana de Pediatría, AAP, en 2008

definió la atopía como la tendencia personal o familiar de producir anticuerpos inmunoglobulina IgE específica, como respuesta a dosis bajas de alérgenos. Se engloban aquí como enfermedad atópica, la dermatitis atópica, las alergias alimentarias, la rinitis alérgica y el asma (Figura 7) (Greer et al., 2008).

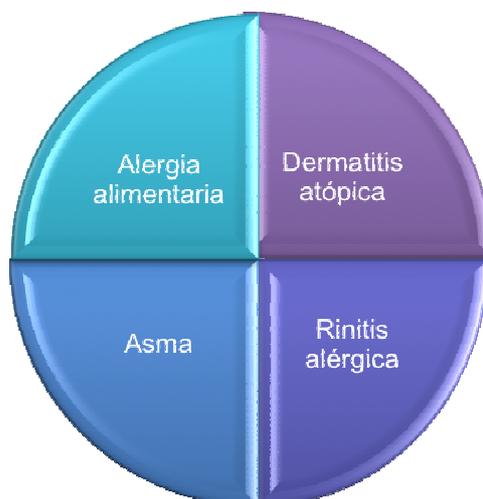


Figura 7. Enfermedades reconocidas como atópicas.

El desarrollo de las enfermedades atópicas depende de varios factores:

- Factores genéticos.
- Exposición a factores medioambientales.
- Interacción entre las células T_{H1} y T_{H2} .

Marcha atópica

Durante los primeros meses de vida, la primera respuesta mediada por IgE se dirige hacia alérgenos alimentarios, concretamente leche de vaca y huevo, siendo la sensibilización hacia aeroalérgenos de comienzo tardío, sobre los 10 años de edad (Figura 8). Cada vez existe una mayor evidencia sobre el papel de la programación temprana en el desarrollo de alergias; así pues, el desarrollo de alergias en edades adultas parece estar determinado durante el periodo prenatal y postnatal temprano, mientras que la alteración en el estilo de vida y la alimentación tardía son efectos secundarios de la programación inmunológica, que tiene lugar durante la gestación y la infancia temprana (Prescott and Bjorsten 2007).

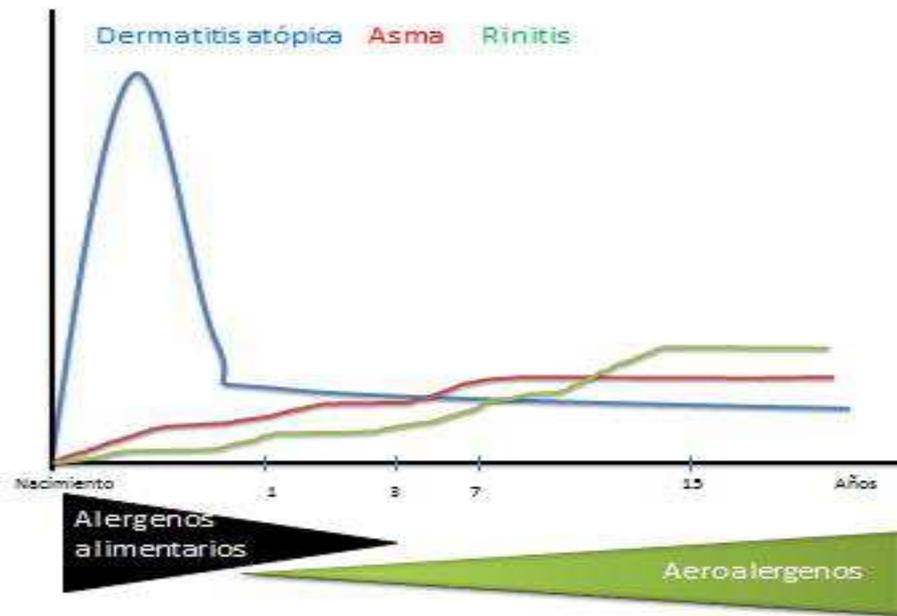


Figura 8. Esquema de la marcha atópica. Prevalencia de los distintos tipos de alergia en función de la edad.

Se denomina marcha atópica al historial de manifestaciones atópicas caracterizadas por la aparición de anticuerpos IgE específicos y a los síntomas clínicos que aparecen a una edad determinada, persisten durante años y/o décadas y a menudo tienden a remitir con la edad (Figura 8) (Wahn, 2008). La marcha atópica comienza en la infancia temprana con la dermatitis atópica, relacionada a menudo con reacciones alérgicas a los alimentos durante los tres primeros años de vida; continúa con una recuperación parcial de este tipo de reacciones y es sustituida por el asma bronquial y la rinoconjuntivitis alérgica en la infancia tardía y la adolescencia (Figura 8) (Halcken, 2004; Greer et al., 2008; Wahn, 2008). La dermatitis atópica es la principal manifestación de la marcha atópica, con una mayor incidencia durante los tres primeros meses de vida y mayor prevalencia durante los 3 primeros años de vida. La rinoconjuntivitis alérgica estacional no se observa normalmente durante los 2 primeros años de edad. Sibilaciones asmáticas persistentes, relacionadas con una temprana sensibilización hacia alérgenos alimentarios y posteriormente hacia aeroalérgenos, suelen observarse durante la infancia (Wahn, 2008).

En un estudio multicéntrico sobre alergias desarrollado en Alemania se ha comprobado que la incidencia de sensibilización hacia alérgenos alimentarios es de un 10% al año de edad, mientras que disminuye a un 3% a los seis años de edad. Por el contrario la sensibilización hacia alérgenos medioambientales por inhalación aumenta con la edad: de un 1.5% a la edad de 1 año hasta un 8% a los 6 años de edad (*Pali-Schöll et al., 2009*). La prevalencia de enfermedades alérgicas en Australia, Finlandia y otros muchos países ha aumentado y el número de niños en edad escolar con asma, dermatitis atópica y rinitis alérgica es cada vez mayor (*Schernhammer et al., 2008; Björkstén et al., 2008*). La prevalencia de enfermedades alérgicas, excluyendo los casos en que hay un historial alérgico en la familia, es de un 15-20%. Esta prevalencia aumenta significativamente, y puede alcanzar hasta un 70-80%, cuando los dos padres presentan las mismas manifestaciones alérgicas (*Halken S, 2004*).

Alergias alimentarias

El término de alergia alimentaria hace referencia a la reacción inmune, mediada por IgE u otras, que se desarrolla en respuesta a la ingestión de un determinado tipo de alimentos; en este sentido representa una respuesta anormal de la mucosa gastrointestinal hacia los antígenos recibidos por vía oral (*Johansson et al., 2001; Boné et al., 2009*). Este término también se utiliza para indicar respuestas inmune adversas hacia alimentos, incluidas las reacciones mediadas por células. Sin embargo, cuando hablamos de sensibilización estamos indicando que están presentes las inmunoglobulinas IgE específicas para determinados alimentos o alérgenos alimentarios, sin existir necesariamente manifestación de síntomas clínicos (*Sicherer et al., 2004*). Las manifestaciones de alergia alimentaria pueden ser desde leves hasta un nivel de shock anafiláctico, pudiendo estar implicados diferentes órganos: cavidad oral, tracto gastrointestinal, sistema respiratorio, piel, etc. Las reacciones severas, e incluso fatales, pueden aparecer a cualquier edad y, a veces, cuando tiene lugar la primera exposición a un alimento; pero el mayor riesgo de anafilaxia fatal inducida por alimentos suele aparecer en adolescentes y adultos jóvenes diagnosticados con asma y/o alergia a determinados alimentos, como frutos secos y marisco (*Sicherer et al., 2004*).

La alergia alimentaria es el término apropiado para definir una hipersensibilidad alimentaria cuando existe un mecanismo inmunológico. Considerando el mecanismo inmune implicado en la respuesta alérgica, las reacciones alérgicas alimentarias, desde una perspectiva patogénica, quedan clasificadas como sigue (*Johansson et al., 2004*):

- Reacciones mediadas por IgE
- Reacciones no mediadas por IgE
- Una combinación entre mediadas y no mediadas por IgE

Estos tres tipos de alergias alimentarias no se diferencian en función de los síntomas gastrointestinales, pues muchos son compartidos, sino en el comienzo, severidad y duración de los mismos (*Sampson y Anderson, 2000*). Además, en la mayoría de los casos de alergias alimentarias con sintomatología gastrointestinal la naturaleza inmunológica de las reacciones no es demostrable.

- Reacciones mediadas por IgE: Los síntomas aparecen inmediatamente después de la ingestión o durante las dos siguientes horas, manifestándose dicha reacción alérgica en forma de hipersensibilidad gastrointestinal inmediata hasta síndrome oral de alergia o anafilaxia. El mecanismo patogénico implica la intervención de anticuerpos específicos IgE. Estas reacciones son fácilmente identificadas y diagnosticadas mediante el test cutáneo de prick y la cuantificación de anticuerpos en el suero (*Boné et al., 2009; Sicherer et al., 2004*).
- Reacciones no mediadas por IgE: Son desórdenes de naturaleza transitoria y pueden tener repercusiones en el estado nutricional del paciente. A diferencia de las reacciones mediadas por IgE, no existe un mecanismo inmunológico establecido y, desde la primera ingestión de la proteína causante de la reacción alérgica hasta la aparición de los primeros síntomas gastrointestinales, se produce un estado de latencia; la sintomatología no es inmediata. Los desórdenes digestivos (proctocolitis alérgica, enterocolitis, enteropatías a proteínas alimentarias) suelen aparecer en los primeros meses de vida y desaparecer a los dos años de edad.

- La proctocolitis se caracteriza por la presencia de sangre en las heces; el mecanismo inmunológico implicado no parece muy claro, aunque se conoce que no existe intervención de IgE.
- La enterocolitis se caracteriza por vómitos acompañados de diarrea, que puede conducir a deshidratación e hipotensión, e incluso letargo y shock. En el mecanismo inmunológico intervienen células T.
- Las enteropatías a proteínas alimentarias se caracterizan por diarreas crónicas, vómitos y retraso en la ganancia de peso. Al igual que en el caso de la enterocolitis, están implicados mecanismos inmune celulares, que provocan inflamación y daños en las paredes del tracto digestivo. La principal causante de las enteropatías es la leche de vaca, aunque también pueden estar implicados la soja, huevos, pescados y cereales. La enteropatía a la leche de vaca suele desaparecer a los dos años, aunque en algunos casos persiste durante la infancia (*Sampson, 2004*).
- Las reacciones combinadas, mediadas por IgE y no mediadas, se caracterizan por no tener un mecanismo etiopatogénico claro, aunque son principalmente desórdenes gastrointestinales eosinofílicos (esofagitis, gastroenteritis y colitis eosinofílica) por lo que se caracterizan. El diagnóstico se basa en síntomas gastrointestinales, infiltración de eosinófilos en una o más regiones gastrointestinales y la ausencia de otras causas de eosinofilia en los tejidos. En el 50% de los casos existe eosinofilia periférica. La prevalencia de este tipo de alergia ha aumentado en los últimos años en los países industrializados. El 81% de los pacientes afectados son atópicos (*Boné et al., 2009*).

Cualquier alimento es susceptible de provocar una reacción alérgica; sin embargo los alimentos responsables mayoritariamente de reacciones alérgicas son los huevos, pescados, leche, mariscos, frutos secos, etc. (*Sicherer et al., 2004*). Actualmente muchos alérgenos alimenticios han sido caracterizados a nivel molecular. Los principales alérgenos alimenticios identificados como alérgeno clase

I son glicoproteínas solubles en agua de tamaño molecular entre 10 y 70 kDa, estables al calor, a la acidez y a la acción de proteasas como, por ejemplo, las caseínas de la leche, la proteína ovomucoide del huevo, las vicilinas (Peso Molecular: 63.5 kDa) de los cacahuets.

El principal alérgeno del huevo es el ovomucoide (Gal d1), que es un inhibidor de la enzima tripsina y representa el 10% del contenido proteico de la clara. Este componente es termoestable y presenta resistencia a la acción de las proteasas, por lo que resulta alergénico en cantidades mínimas. En el pescado, el alérgeno se encuentra en unas proteínas, las parvalbúminas, situadas en el músculo; se trata de alérgenos resistentes al calor y a las proteasas. En el cacahuete se conocen múltiples alérgenos. El cacahuete tostado es capaz de unir 90 veces más IgE de los sueros de los pacientes alérgicos a cacahuete que el crudo y, además, el cacahuete tostado es más resistente a la degradación de proteasas endógenas y la digestión gástrica (SEAIC, 2004). El huevo es la principal causa de alergia, seguido de la leche en la infancia; sin embargo, en el tercer puesto, el alérgeno varía dependiendo de la situación geográfica; en España la tercera causa de alergia en la infancia es el pescado, en EEUU y Suiza los cacahuets, en Alemania y Japón el trigo (Tabla 2) (Fiocchi et al., 2010).

Tabla 2. Principales alérgenos en la infancia. (Adaptada de Fiocchi et al.2010).

País	1º	2º	3º
USA	Huevo	Leche de vaca	Cacahuets
Alemania	Huevo	Leche de vaca	Trigo
España	Huevo	Leche de vaca	Pescado
Suiza	Huevo	Leche de vaca	Cacahuets
Israel	Huevo	Leche de vaca	Sésamo
Japón	Huevo	Leche de vaca	Trigo

Prevalencia e incidencia de alergias alimentarias

Las alergias alimentarias mediadas por IgE afectan al 2% de los adultos y a entre un 4-8 % de niños (EFSA, 2004); algunos estudios recientemente realizados en Europa sostienen que esta prevalencia ha aumentado. En la población europea, se

estima que entre 11 a 26 millones de europeos sufren alergias alimentarias. En las últimas décadas las alergias en los países desarrollados han crecido casi exponencialmente. Las alergias alimentarias son más comunes en niños (6% en niños menores de 3 años) que en adultos (*Sicherer et al., 2004*).

En Estados Unidos el 4% de los adultos y un 8% de los niños menores de 3 años sufren alergias alimentarias (*Boné et al., 2009*). En España, uno de cada 10 niños menores de cuatro años y el 2% de los adultos sufren alergias alimentarias (*datos del estudio Alergológica 2005*). Según datos de la *Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC)*, la incidencia de la alergia a alimentos se ha duplicado en sólo una década. El informe 'Alergológica', elaborado por esta Sociedad con los datos recogidos en las consultas de alergología españolas, indica que en 1992 la incidencia era del 3,6% mientras que en 2005 esta cifra ya ascendía al 7,4%. Es difícil establecer la prevalencia de alergias alimentarias no mediadas por IgE, sin embargo en edades pediátricas el 50% de las APLV son no mediadas (*Maloney y Nowak-Wegrzyn., 2007*)

'Europrevall' (FOOD-CT-2005-514000) es el primer estudio que evalúa el impacto sobre la calidad de vida de los pacientes y los costes socioeconómicos asociados a la alergia a alimentos. A través de cuestionarios validados en 9 países europeos, entre los que se encuentra España, se demuestra un mayor impacto en la calidad de vida de los sujetos alérgicos en los países mediterráneos frente al Norte de Europa (*Keil et al., 2010; McBride et al., 2012*).

Diagnóstico de alergias alimentarias

El diagnóstico de alergias alimentarias se realiza a partir de las siguientes pruebas:

- Historial clínico.
- Test cutáneo de prick para el alérgeno alimentario.
- Medidas de IgE específica mediante ensayos serológicos.

- Ensayo de provocación.

En el diagnóstico clínico de las alergias alimentarias mediadas por IgE la decisión sobre que método diagnóstico utilizar en la práctica clínica debe considerar distintos factores tales como el grupo de población, los test disponibles, la seguridad, los costes así como las características diagnósticas (*Soares et al., 2013*). El ensayo de provocación oral representa el estándar de oro en el diagnóstico de niños con sospecha de alergias alimentarias (*Sicherer et al 2004; Niggemann y Beyer, 2007*).

En el diagnóstico la medicación debe ser chequeada, pues a veces se enmascaran los síntomas clínicos. Si se sospecha que un alimento es el responsable de la aparición de síntomas en los niños, *Niggemann y Beyer* sugieren comenzar el diagnóstico con una dieta de eliminación antes de realizar el test de provocación. Estos investigadores sugieren el siguiente árbol de decisiones (Figura 9). En una dieta de eliminación solamente es retirado el alimento sospechoso; sin embargo las dietas oligoalérgicas son más restrictivas (ejemplo: 1 cereal (arroz), 1 carne (cordero o pavo), 2 vegetales (coliflores, pepinos, brócoli), 1 fruta (pera, banana), grasas (aceite de girasol o margarina sin leche), agua y especias (sal y azúcar)). La duración de la dieta antes de realizar la prueba de provocación depende de los síntomas; en el caso de síntoma de alergia mediada por IgE sólo requiere una semana de dieta, pero en el caso de eczema atópico o síntomas gastrointestinales, la duración será de dos semanas. Si la eliminación o la dieta oligoalérgica no tienen efectos en los síntomas, entonces no es necesario realizar la prueba de provocación y no parece necesario aplicar una dieta específica (*Niggeman y Beyer, 2007*).



Figura 9. Árbol de decisiones para la elección de una dieta antes del test de provocación. (Adaptada de Niggemann y Beyer, 2007).

El único tratamiento eficaz de la alergia alimentaria, cualquiera que sea su patogenia, es evitar el contacto y la ingestión del alimento sensibilizante mediante una dieta de eliminación estricta (AESAN 2007). Las dietas de eliminación conducen a la pérdida de reactividad a muchos alimentos y al desarrollo de tolerancia clínica después de uno o dos años en niños y adultos con alergia alimentaria mediada por IgE. En las alergias alimentarias, la tolerancia se alcanza transcurrido un periodo de tiempo. Son recomendables re-evaluaciones periódicas de acuerdo con el historial clínico y el tipo de alimento (Sicherer et al., 2004).

Alergia a las proteínas de la leche de vaca

La leche de vaca (LV) es un alimento ampliamente consumido y aceptado en todo el mundo debido a su buena palatabilidad, alto valor nutricional y disponibilidad; sin embargo, su consumo puede causar daños en algunos sujetos, bien por contaminación de la leche con algún agente dañino o por el consumo de este alimento por sujetos susceptibles de ocasionarles algún desorden en la digestión,

absorción, metabolismo o reacción inmunológica (Bahna, 2002). La alergia a la proteína de la leche de vaca es una reacción clínica adversa, asociada a la unión de inmunoglobulinas IgE a los antígenos, desencadenando una respuesta inmune (Johansson et al., 2004). Las reacciones adversas a la proteína de la leche de vaca (PLV) se clasifican en alergias a las proteínas de la leche de vaca (APLV) e intolerancias a las proteínas de la leche de vaca (IPLV). Estas reacciones no se diferencian en base a los síntomas sino en la respuesta mediada por inmunoglobulinas, principalmente IgE en el caso de la APLV y en una respuesta no mediada por inmunoglobulinas, en el caso de la IPLV. Tanto la alergia como la intolerancia pueden inducir un amplio rango de síntomas comunes:

- Síntomas cutáneos (dermatitis atópica, urticaria, angioedema).
- Síntomas respiratorios (rinitis, tos, asma).
- Síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, cólico, reflujo gastroesofágico).

La aparición de síntomas suele ir acompañada de rechazo de comida, fallo de medro e irritabilidad (Novembre y Vierucci, 2001). En la infancia, la PLV constituye el primer alérgeno alimenticio con el que se encuentra el lactante (Host, 2002; Vandenplas et al., 2007).

Las proteínas responsables de la APLV se distribuyen en las fracciones de caseína y suero (Tabla 3). El suero proteico de la LV está constituido por proteínas globulares. En él encontramos como alérgenos a la α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, seroalbúmina e inmunoglobulinas bovinas. Los alérgenos más abundantes son la β -lactoglobulina (3-4 g/l) y la alfa-lactoalbúmina (1-1.5 g/l), hecho que se repite en la leche de muchos mamíferos menos en la leche materna, donde la β -lactoglobulina está prácticamente ausente (Blanc et al., 2008).

- La β -lactoglobulina (*Bos d 5*), es una proteína sintetizada en la glándula mamaria; es la proteína más abundante en el suero proteico de la LV y en la de otros mamíferos, pero no está presente en la leche humana. Se trata de un dímero proteico de aproximadamente 36 kDa (Blanc et al., 2008; Fiocchi et al., 2010). Al no estar presente esta proteína en la leche humana, se considera el alérgeno más importante. Entre un 15-76% de los sujetos con

APLV reaccionan a esta proteína (*Restani et al., 2009*) y el 73.7% de los niños con APLV dan positivo el test cutáneo (SPT), a esta proteína (*Fiocchi et al., 2010*).

Tabla 3. Proteínas de la leche de vaca.

Proteínas (leche de vaca)	Nomenclatura Alergeno	Pesos Moleculares KDa	% del total de proteínas
Caseínas	Bos d 8		80
α s1-caseína		23.6	29
α s2-caseína		25.2	8
β -caseína		24	27
κ -caseína		19	10
γ 1-caseína		20.6	
γ 2-caseína		11.8	6
γ 3-caseína		11.6	
Proteínas del suero			20
α -lactoalbúmina	Bos d 4	14.2	5
β -lactoglobulina	Bos d 5	18.3	10
Seroalbúminas	Bos d 6	67.0	1
Inmunoglobulinas	Bos d 7	160.0	3
Lactoferrina		800.0	Trazas

- La α -lactoalbúmina (*Bos d 4*) o A-LA, es una proteína globular monomérica de peso molecular aproximadamente 14.2 kDa. Es un componente regulador del sistema enzimático galactosil transferasa responsable de la síntesis de lactosa. Además posee una alta afinidad por el calcio y esta unión estabiliza su estructura secundaria. La secuencia aminoacídica completa de esta proteína muestra cierta homología con la lisozima de la clara de huevo y la A-LA de la leche humana (*Blanc et al., 2008, Fiocchi et al., 2010*). Existe controversia sobre el papel que juega esta proteína en la APLV, pues la prevalencia de los pacientes que reaccionan frente a esta proteína varía entre un 0 y un 80% (*Bessler et al., 2002*) sin embargo, el 75% de los niños con APLV dan positivo en el test cutáneo (SPT) a esta proteína (*Fiocchi et al., 2010*).

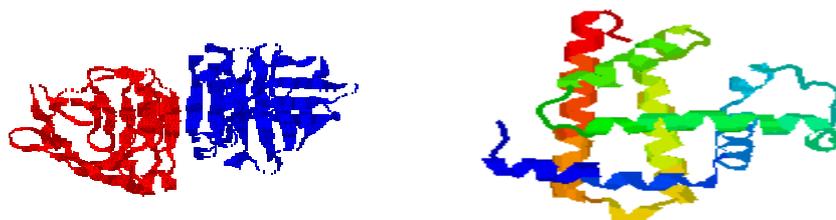


Figura 10. Estructura de la β -lactoglobulina (izquierda) y ALA (derecha).

- Las albúminas del suero bovino (*Bos d 6*) son proteínas presentes en el suero proteico, con capacidad para unirse a agua, ácidos grasos, hormonas, bilirrubina, Ca^{+2} , K^+ , Na^+ , siendo su función principal la regulación de la presión sanguínea. La prevalencia de sujetos con APLV que reaccionan frente a esta proteína se sitúa en rangos que oscila entre el 0 al 88% y en el caso de niños con APLV un 62.5% están sensibilizados (*Fiocchi et al., 2010*). Esta proteína está implicada tanto en la APLV como en reacciones alérgicas a la ternera. La sintomatología es inmediata, presentando episodios de edema labial, urticaria, tos y rinitis. Niños con alergia a la proteína de la ternera suelen ser también alérgicos a la leche (*Fiocchi et al., 2001*); sin embargo, lactantes con APLV no tienen por qué presentar también sensibilización a la proteína de ternera (*Werfel et al., 1997*). La carne de ternera no debe ser excluida de la dieta de los niños con APLV como norma general, sino que esta exclusión debe ser evaluada caso por caso.
- Las inmunoglobulinas bovinas (*Bos d 7*), son proteínas presentes en los tejidos, sangre, fluidos y secreciones como la leche y rara vez causan síntomas clínicos de alergia a la leche de vaca.
- La caseína (*Bos d 8*), constituye el coágulo, la fracción sólida de las proteínas obtenida tras la coagulación de la leche. Está constituida por 4 componentes (α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína y κ -caseína) los cuales interaccionan formando agregados micelares en suspensión en el lactosuero. Existe también un quinto componente, las γ -caseínas, subproductos de la proteólisis de la β -caseína, presentes en la LV a muy baja proporción (*Fiocchi et al., 2010*). Al no poseer una estructura compacta, es rápida y extensamente degradada por enzimas proteolíticos durante la digestión (*Dupont et al.; 2010*). Aunque no se ven afectadas significativamente por los tratamientos térmicos severos, si son muy susceptibles a la acción de exopeptidasas y todas las proteasas (*Blanc et al., 2008*). Varias hipótesis tratan de explicar el potencial alergénico de las caseínas (*Dupont et al., 2010*):
 - La resistencia a la digestión por presencia de secuencias fosforiladas
 - La protección de las caseínas por la grasa
 - La desnaturalización térmica del suero

- La inmadurez de los sistemas inmune y digestivo en el lactante

En el caso de los alérgenos de la caseína, las sensibilizaciones suelen darse normalmente a la α -caseína (100% de los casos) y κ -caseína (91.7% de los casos) (Fiocchi et al., 2010).

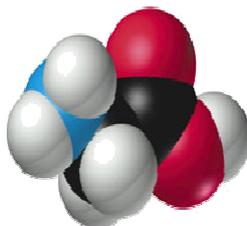


Figura 11. Estructura de las caseínas.

Las proteínas lácteas de diferentes mamíferos (vaca, oveja, cabra, búfala, dromedaria, yegua) se caracterizan por presentar secuencias similares, siendo la homología más acusada entre las proteínas lácteas de vaca, oveja y cabra (Tabla 4) (Restani et al., 1999). Las leches de camella y dromedaria no contienen β -lactoglobulina y no presentan homología con la leche de vaca. Estas dos características plantean la posibilidad de su utilización en el tratamiento nutricional de la APLV (Restani et al., 2002); de hecho, las leches de mona y yegua han sido testadas en algunos pacientes (Vita et al., 2007; Monti et al., 2007). Sin embargo, existe incertidumbre sobre el control higiénico y la composición química de las mismas (Fiocchi et al., 2010).

La leche de cabra contiene proteínas similares a la LV y en proporciones similares, funciones biológicas, estructura y funcionalidad. La concentración del suero proteico es de 4-5 g/l, caseína 25-30 g/l. La caseína de la leche de cabra está constituida básicamente de β -caseína (18 g/l) y α s1-caseínas (0.6 – 3.6 g/l). La mayoría de los pacientes con APLV, suelen presentar reactividad cruzada entre las caseínas de la LV y la de la leche de cabra (Restani et al., 1999).

Tabla 4. Porcentaje de homologías de proteínas lácteas de mamíferos con las proteínas de la leche de vaca (Fiochi et al., 2010)

Proteínas (leche de vaca)	Cabra	Oveja	Leche Humana
α s1-caseína	87.9	88.3	32.4
α s2-caseína	88.3	89.2	----
β -caseína	91.1	92.0	56.5
κ -caseína	84.9	84.9	53.2
α -lactoalbúmina	95.1	97.2	73.9
β -lactoglobulina	94.4	93.9	Ausente
Seroalbúminas	---	----	76.6

En resumen, los alérgenos más importantes encontrados en la LV son cuatro caseínas (α s1-, α s2-, β y κ) y dos proteínas del suero (α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina).

Fisiopatología y prevalencia de la APLV

La APLV es la alergia alimentaria más común en la infancia temprana, debiéndose a una inmadurez de la respuesta del sistema inmunitario local y sistémico junto a un aumento de la permeabilidad del intestino. Este hecho conduce a la presentación de péptidos lácteos de cadena larga al sistema inmunitario gastrointestinal, desencadenando una respuesta alérgica en lactantes susceptibles (Wal, 2004).

En la APLV mediada por IgE las principales manifestaciones son (Host A, 1994):

- Síntomas dermatológicos (urticaria, angioedema, enrojecimiento) en el 30-70% de los casos.
- Manifestaciones gastrointestinales (vómitos, dolor abdominal) en el 50-60 % de los casos.
- Síntomas respiratorios (sibilaciones, disnea, cianosis) en un 20-30 % de los casos.

En la APLV no mediada por IgE las principales manifestaciones son (Maloney y Nowak-Wegrzyn, 2007):

- Proctocolitis alérgica.
 - Síndrome de enterocolitis inducido por proteínas alimentarias Food Protein Induced Enterocolitis Syndrome (FPIES).
 - Gastroenteritis alérgica eosinofílica.
 - Dermatitis atópica.
-
- La proctocolitis alérgica se suele presentar en los 6 primeros meses de vida, en lactantes alimentados con lactancia materna o fórmulas a base de LV o soja. La sintomatología se caracteriza por la presencia de sangre en heces. Aparentemente el aspecto del lactante es el de un lactante sano, no presentando pérdida de peso o retraso en el crecimiento. El diagnóstico se base en el historial clínico, test de prick y concentración de IgE específica negativa. Aunque no se recomienda rutinariamente en el diagnóstico una histopatología a partir de una biopsia, esta puede mostrar la infiltración eosinofílica en el epitelio del colon, lamina propia y musculatura (*Maloney y Nowak-Wegrzyn, 2007*). El tratamiento consiste en la eliminación de la proteína de la dieta con una resolución de los síntomas en 48-72 horas. La tolerancia suele aparecer al año de edad. La proctocolitis alérgica aparece en el 60% de los casos en lactantes alimentados con lactancia materna, siendo el contenido de β -lactoglobulina en la leche materna la causante de esta enfermedad, por lo que se recomienda a la madre lactante la eliminación de la leche de vaca de su dieta. En aquellos casos en los que los síntomas (sangrado en heces) no remiten, se aconseja la utilización de una fórmula hidrolizada y en casos extremos una dieta elemental (*Sampson y Anderson, 2000*).

 - El síndrome de enterocolitis suele aparecer en lactantes alimentados con fórmula de LV o soja. De hecho, el 50% de los pacientes con reacciones debidas a la LV lo son también a la soja (*Sicherer et al., 1998*). La sintomatología se caracteriza por vómitos y diarrea causando deshidratación y letargo, fallo de medro e hipoalbuminemia cuando la exposición es crónica. En el diagnóstico el test cutáneo (SPT) y la

concentración de IgE específica son negativos. Los padres deben tener un plan de actuación en el caso de ingestión accidental. Los síntomas suelen aparecer dos horas después de la ingestión y puede desencadenarse una deshidratación. Durante el tratamiento es necesario procurar la hidratación aunque, si el síndrome aparece con enfermedades mediadas por IgE es necesaria también la administración de medicamentos con antihistamínicos. Los síntomas remiten cuando la proteína es eliminada de la dieta. La reintroducción de la proteína causante de la reacciones se realizará bajo supervisión médica. La mayoría de los pacientes con síndrome de enterocolitis causada por la LV se convierten en tolerantes a la edad de los tres años (*Maloney y Nowak-Wegrzyn, 2007*). En los últimos años se ha observado que pacientes con clínica alérgica que presentaban el síndrome de enterocolitis inducido por proteínas alimentarias, tras recuperarse de esta enfermedad, desarrollaban posteriormente APLV mediada por IgE (*Kessel y Dalal, 2011*). La inflamación causada en el tracto gastrointestinal por el síndrome de enterocolitis podría aumentar la penetrabilidad de las proteínas lácteas y su presentación al sistema inmunitario gastrointestinal. Parece que, en pacientes con este síndrome, la presencia de IgE específica hacia el antígeno, hecho que no es común, predice una prolongada sensibilización hacia el antígeno (*Kessel y Dalal, 2011*).

- La gastroenteritis alérgica es una enfermedad que se caracteriza por una inflamación eosinofílica de los tejidos gastrointestinales (esófago, estómago, intestino). La sintomatología depende de la localización y el grado de inflamación; se caracteriza normalmente por falta de apetito, náuseas, dolor, vómitos, diarrea, pérdida de peso y sangre oculta en heces. Esta enfermedad aparece en la infancia y adolescencia. El diagnóstico suele ser a través de una endoscopia y biopsia y de marcadores de infiltración de eosinófilos en la mucosa y submucosa. Los síntomas suelen remitir a las 6 semanas de eliminación de la proteína causante (leche, huevo, soja, cereales, pescado). La alimentación suele ser a través de fórmulas a base de amino ácidos (fórmulas elementales).

- La dermatitis atópica (DA) es uno de los síntomas más comunes tanto de la APLV como de la IPLV; el 40% de los niños con eczema atópico presentan alergias alimentarias (*Niggemann y Beyer, 2007*) y el 50% de los niños menores de un año con APLV o IPLV tiene DA (*Novembre y Vierucci, 2001*). Los niños con DA están predispuestos a sensibilizarse a los alimentos en los primeros años de vida y a los aeroalérgenos posteriormente. Por ello, lactantes con DA al igual que lactantes con APLV, requieren la ausencia de la PLV en su dieta al menos durante el primer año de vida.

Diagnóstico de la APLV

El diagnóstico de la APLV comienza con la sospecha y finaliza con una prueba de provocación oral, realizada siempre bajo la supervisión de un especialista. Algunos de los factores más importantes a tener en cuenta en el diagnóstico son:

1. Edad de aparición de la alergia.
2. Naturaleza de los síntomas.
3. Frecuencia de las manifestaciones.
4. Periodo transcurrido entre la ingesta y la aparición de síntomas.
5. Cantidad de leche que provoca los síntomas.
6. Método de preparación de la leche.
7. Reproducibilidad de las reacciones.
8. Intervalos de tiempo desde la última reacción.
9. Influencia de factores externos.
10. Alimentación diaria.
11. Crecimiento.
12. Detalles de la alimentación temprana.
13. Efectos de las dietas de eliminación.

En el año 2007 se publicó una guía para el diagnóstico y manejo de la APLV en lactantes, sugiriendo algoritmos distintos para lactantes con lactancia materna y lactantes alimentados con fórmulas infantiles, siendo además el diagnóstico y tratamiento distinto, dependiendo de la severidad de los síntomas. En el caso de sospecha suave a moderada de APLV en lactantes alimentados con lactancia materna, como primera medida en el diagnóstico se mantiene la lactancia, eliminando de la dieta de la madre la LV durante al menos dos semanas. En la Figura 12 se muestra el algoritmo a seguir cuando los lactantes han sido alimentados previamente con fórmulas infantiles en lugar de lactancia materna (Vandeplas et al., 2007).



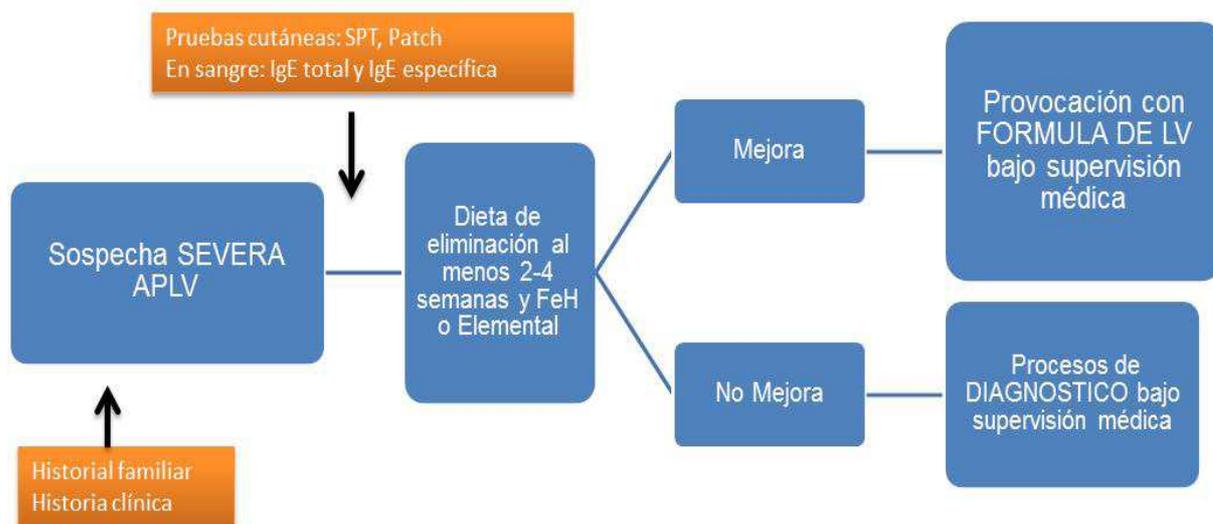


Figura 12. Algoritmos para el diagnóstico y manejo de la APLV moderada y severa cuando fueron alimentados con fórmulas artificiales. (Adaptada de Vandeplass y col. 2007)

Recientemente el comité de *ESPGHAN* ha publicado un documento sobre el diagnóstico y manejo de la APLV en lactantes y niños de corta edad (*Koletzko et al., 2012*). El diagnóstico de la APLV mediada por IgE, comprende tres etapas:

- Historia clínica compatible con las manifestaciones alérgicas típicas.
- Demostración o no de sensibilización mediada por IgE mediante pruebas cutáneas (SPT) con el alérgeno adecuado y/o IgE sérica específica para la leche y sus proteínas.
- Prueba de provocación/tolerancia controlada, salvo contraindicación clínica.

En pacientes con alta probabilidad de APLV mediada por IgE y un resultado del SPT positivo (valor de diámetro de la pápula ≥ 3 mm) puede ayudar a evitar el test de provocación oral en el 49-70% de los pacientes, pero el beneficio de no realizar el test de provocación vendrá contrarrestado por un 5-6% de riesgo de falsedad (*Fiocchi et al., 2010*). Estudios recientes han demostrado que un aumento de la concentración de IgE específica en suero y/o un aumento del diámetro de la pápula se correlacionan con un aumento del riesgo de reacción alérgica (*Sicherer et al., 2004*).

El test de provocación oral se considera el test estándar de referencia en el diagnóstico de la APLV. Es un test laborioso y no está libre de riesgos para el paciente. En niños con reacciones anafilácticas previas a la LV estará contraindicado, excepto en los dos casos siguientes (*Fiocchi et al., 2010*):

- Situaciones en las que la anafilaxia suceda inmediatamente después de una comida sólida que contenga proteínas lácteas y otros alérgenos alimenticios.
- En la valoración de la tolerancia de la LV transcurrido un periodo razonable desde la última reacción anafiláctica.

Sobre el test de provocación oral no existe un consenso en cuanto a dosis y ritmos de introducción del alérgeno causante de la alergia. Se han sugerido dosis iniciales de 0.1 ml pero puede variar de acuerdo al tipo de alergia (mediada o no mediada) y al riesgo de reacción (*Bindsley et al., 2004; Nowak-Wegrzyn et al., 2009*).

Respecto al diagnóstico de la APLV no mediada por IgE, se recomienda basar el diagnóstico en tres pilares:

- Historia clínica compatible.
- Demostración de alteraciones morfológicas o funcionales digestivas y test inmunológicos en los que no se confirma una sensibilización mediada por IgE. Puede detectarse IgE pero no se demuestra relación causal o sólo se demuestra parcialmente
- Prueba de provocación/tolerancia controlada. Debe valorarse inicialmente en el diagnóstico si la clínica es dudosa y a medio plazo en la evolución.

El diagnóstico de la APLV no mediada por IgE suele basarse en la presencia en heces de marcadores de activación eosinófila, esteatorrea, patch test o determinación de citocinas proinflamatorias en heces (IL-4, IL-5 y TNF- α) (*Bousoño et al., 2007*).

Tanto la APLV mediada como la no mediada por IgE, pueden inducir una amplia variedad de síntomas, siendo en ocasiones complicado distinguir entre la alergia y la intolerancia:

- Síntomas cutáneos (DA, urticaria, angioedema).

- Síntomas respiratorios (rinitis, asma, tos)
- Síntomas gastrointestinales (vómitos, diarrea, cólico, reflujo gastroesofágico)
- Síntomas generales (fallo de medro, irritabilidad y rechazo de alimentos)
- Anafilaxia.

Por lo tanto, no podemos diagnosticar una alergia o una intolerancia basándonos únicamente en la sintomatología, al igual que no se debe diagnosticar una IPLV cuando no existen pruebas analíticas, o dichas pruebas son negativas (*Novembre y Vierucci, 2001*). No existe un único test para el diagnóstico. La confirmación de APLV o IPLV se realizará siempre mediante un test de eliminación y provocación de la proteína en cuestión. Se utilizan unos criterios de diagnóstico bien definidos, basados en la reducción significativa de síntomas con la eliminación de la PLV de la dieta, reaparición de síntomas con el test de provocación y nueva eliminación, que da lugar a la desaparición de síntomas. De esta manera se puede descartar la intolerancia a la lactosa así como infecciones de análoga sintomatología (*Host et al., 2002*). Es necesario el concurso de nuevas armas diagnósticas para el estudio de las manifestaciones alérgicas, especialmente, las no IgE-mediadas (Tabla 5) (*Sicherer et al., 2004; Bousoño et al., 2007*).

Tabla 5. Nuevos estudios diagnósticos en alergias alimentarias.

Nuevos estudios diagnósticos en alergia alimentaria	
IgE mediada	IgE no mediada
Niveles de IgE específica	Patch test
Prick test	Test de proliferación linfoblástica in vitro
Test in vitro para predecir la tolerancia oral	Liberación de citocinas bajo estimulación de alimentos
Empleo de alérgenos recombinantes	Determinación de citocinas proinflamatorias en suero/heces (IL4, IL5 y TNF α)
	Marcadores de activación eosinofílica en heces (proteína catiónica eosinofílica)

Tratamiento Nutricional de la APLV/IPLV

El mejor tratamiento es prolongar la lactancia materna. La lactancia deberá ser mantenida el mayor tiempo posible y, mientras tanto, la madre deberá suprimir de su dieta la LV, sus derivados y otros alimentos que puedan contener proteínas de la

leche de vaca (*Vandenplas et al., 2007*). La leche materna es el estándar de oro en la alimentación del lactante, desde un punto de vista nutricional e inmunológico. El último informe de la *Academia Americana de Pediatría* sobre el tratamiento dietético en la prevención de las enfermedades atópicas en la infancia sostiene que, la lactancia materna exclusiva durante al menos los cuatro primeros meses de vida en niños con alto riesgo a desarrollar enfermedades atópicas en lugar de una alimentación basada en fórmulas con LV intacta, disminuye la incidencia de alergia a la PLV y la DA durante los dos primeros años de vida (*Greer et al., 2008*). Solamente en aquellos casos en los que no sea suficiente o posible la lactancia materna se recurrirán a fórmulas especiales diseñadas para el tratamiento de la APLV (*Comité de Nutrición de la AEP, 2001; Dalmau et al., 2008*).

Distintos organismos internacionales han emitido guías para el tratamiento y diagnóstico de la APLV que pueden verse en la Tabla 6. Dichas recomendaciones se resumen en las siguientes pautas:

- Lactancia materna al menos durante los 6 primeros meses de vida con una dieta de la madre exenta de productos lácteos.
- Fórmulas extensamente hidrolizadas (PM < 3000 Da) en aquellos casos en los que no sea posible la lactancia materna.
- Calendario habitual de introducción de alimentos, comenzando por los alimentos de menor alergenicidad y retrasando la introducción de los más alergénicos: huevo (hasta los 18 meses de edad), pescado y legumbres (hasta el año de edad).
- No introducir los frutos secos hasta los 3 años de edad.

Tabla 6. Recomendaciones de distintos organismos para el tratamiento de la APLV. pHF: Fórmula parcialmente hidrolizada; eHF: Fórmula extensamente hidrolizada; SF: Fórmula de soja; HSF: Fórmula de soja hidrolizada; RHF: Fórmula de arroz hidrolizada; AAF: Fórmula a base de aminoácidos

	AAP Committe on Nutrition 2000	ESPACI/ESPGHAN 1999	AEP 2001
Lactancia materna	Eliminar la leche de vaca de la dieta de la madre	Se debería eliminar la leche de vaca de la dieta de la madre	
Alimentación con fórmula	eHF o SF	Eliminación de alérgenos en fórmulas	
pHF	No indicada.	No indicada.	No indicada.
eHF	Al menos el 90% de los lactantes la toleran.	Recomendada para el tratamiento.	
SF	Pueden ser utilizadas a partir de los 6 meses de edad en niños con APLV mediada por IgE	No son recomendadas para el tratamiento inicial.	
HSF	No especifica nada.	No especifica nada.	
RHF	Posterior a este documento	Posterior a este documento	
AAF	Toleradas	Recomendada para pacientes altamente sensitivos, que no toleran eHF.	
Otras leches	Leches de cabra y otros animales o fórmulas conteniendo proteínas intactas de animal o a base de leche de vaca no son adecuadas.	No deben ser tratados con leches de otras especies (cabra, oveja) por reacción cruzada.	

La guía *DRACMA*, "Diagnóstico y Acción Racional contra a la Alergia a la Leche de Vaca", recientemente publicada en la revista de la *Organización Mundial de Alergia, WAO* en sus siglas inglesas, establece pautas para el diagnóstico y tratamiento de la APLV mediada por IgE (*Fiocchi et al., 2010*). En esta guía se establece un método para la correcta elección de fórmulas de sustitución indicadas para paciente con APLV mediada por IgE (Tabla 7). Para pacientes con APLV no mediada por IgE, enterocolitis gastrointestinal o esofagitis alérgica la elección de la fórmula será diferente. Esta guía se actualizará en el futuro con la inclusión de recomendaciones para pacientes que muestren los desórdenes anteriormente mencionados; sin embargo, este documento menciona brevemente unas recomendaciones para estos casos. En el tratamiento de la APLV (*Fiocchi et al., 2010*):

- La dieta de eliminación debe ser efectiva y completa.
- Se debe prevenir la inhalación y contacto con la piel.
- Una adecuada legislación del etiquetado que indique claramente al consumidor los ingredientes.

- La alergia a la ternera implica también APLV en la mayoría de los casos, no al contrario.
- Todas las dietas de eliminación deben ser nutricionalmente seguras sobre todo en los dos primeros semestres de vida.
- Monitorización de las dietas de eliminación.

Revisiones periódicas a través de test de provocación para prevenir innecesariamente una dieta de eliminación prolongada.

Mientras que en niños menores de 2 años de edad es obligatorio la utilización de una fórmula de sustitución, en niños alimentados con lactancia materna y niños mayores de dos años de edad no tiene por qué ser necesaria (*Fiocchi et al., 2010*).

Tabla 7. Recomendaciones de la guía DRACMA para la correcta elección de una fórmula cuando no es posible la lactancia materna (*Fiocchi et al., 2010*).

Clínica	1ª Elección	2ª Elección
Anafilaxia	AAF	eHF
Urticaria aguda o angioedema	eHF	AAF/SF
Dermatitis atópica	eHF	AAF/SF
Alergia gastrointestinal inmediata	eHF	AAF/SF
Esofagitis eosinofílica alérgica	AAF	
Reflujo gastroesofágico GERD	eHF	AAF
Enteropatía inducida por APLV	eHF	AAF
Síndrome de enterocolitis inducido por PLV, FPIES	eHF	AAF
Gastroenteritis y proctocolitis inducido por PLV		AAF
Cólico	eHF	AAF
Estreñimiento	eHF	AAF
Enfermedad pulmonar crónica inducida por leche (Síndrome de Heiner)	AAF	eHF

Las fórmulas de sustitución que pueden ser utilizadas en el tratamiento de APLV siempre y cuando no sea posible la lactancia materna, son las siguientes:

- **Fórmulas extensamente Hidrolizadas (FeH).** El uso de fórmulas con proteínas extensamente hidrolizadas es recomendado en el caso de lactantes con APLV por distintos organismos científicos (*Comité de Nutrición de la AEP 2001; AAP, Comité de Nutrición de la AAP, 2000; ESPGHAN, Host et al., 1999; WAO, Fiocchi et al., 2010, ESPGHAN, Koletzko et al., 2012*). Las fórmulas extensamente hidrolizadas contienen péptidos de 2-8 aminoácidos, de tamaño molecular menor que 1200 Da,

lactosa no contaminada con proteína de LV o que se demuestre que esa posible contaminación no influye en la tolerancia y evolución a largo plazo (*Comité de Nutrición de la AEP, 2001*).

- **Las fórmulas elementales** están indicadas solo en aquellos casos en los que las fórmulas extensamente hidrolizadas o de soja no sean toleradas (*Comité de Nutrición de AEP, 2001*). Están constituidas por aminoácidos, son amargas y presentan una mayor osmolaridad que las FeH. Normalmente este tipo de fórmulas están indicadas en el caso de malabsorción intestinal.
- **Las fórmulas de soja** no están indicadas para el tratamiento antes de los 6 meses de vida (*Comité de Nutrición de la AEP, 2001; Comité de Nutrición de ESPGHAN, 2006, 2008; Fiocchi et al., 2010*). Tienen mejor sabor y menor precio que los hidrolizados pero no son fórmulas de primera elección. Pueden ser utilizadas cuando el niño no tolera las fórmulas hidrolizadas, siempre que sea mayor de 6 meses y no presente síntomas digestivos.
- **Fórmulas de hidrolizados de arroz** (*Fiocchi 2003; Terraciano et al., 2010*).
- **Otras alternativas** (leche de cabra, de oveja, de rumiantes). La leche de cabra, búfala y oveja no debería ser utilizada en el tratamiento de la APLV. Para niños con más de dos años de edad, la leche de camella puede ser un sustituto y la leche de yegua podría ser válido en niños con comienzo tardío de la alergia (*Fiocchi et al., 2010*); en niños de más de 2 años de edad, en los que se haya comprobado que toleran la leche de cabra, esta puede ser un excelente sustituto, sin embargo no se puede aconsejar su utilización sin testar previamente su tolerancia bajo el control de un especialista (*Infante et al., 2003*).
- La utilización de fórmulas parcialmente hidrolizadas está contraindicada para el tratamiento de APLV.

En ocasiones es complicado encontrar una fórmula de sustitución, segura, nutricionalmente adecuada y con buena palatabilidad. Las guías publicadas por distintos organismos sugieren la utilización de fórmulas extensamente hidrolizadas (Host et al., 1999) y fórmulas de soja (a partir de los 6 meses de vida), como primera línea de tratamiento. En Europa, algunos estudios (Pedrosa et al., 2006; Fiocchi et al., 2003, 2006; Reche et al., 2010) han considerado la utilización de hidrolizados de proteína de arroz para el tratamiento de APLV. Concretamente en el estudio de la cohorte de Milán de APLV, MiCMAC I en sus siglas inglesas, se ha observado que los niños con APLV que eran alimentados con una fórmula hidrolizada de arroz, alcanzaban la tolerancia a los 20 meses, mientras que el grupos alimentados con eHF y SF tardaban más en alcanzar la tolerancia (56 meses y 28 meses) (Terraciano et al., 2010).

En la Tabla 8 se recogen algunas de las fórmulas que actualmente se comercializan en España y Europa para el tratamiento de APLV y atopías.

Tabla 8. Fórmulas comercializadas en España para el tratamiento de la APLV y atopías

Fórmulas extensamente hidrolizadas	Fórmulas derivadas de proteínas vegetales	Fórmula elementales
Blemil Plus FH; Laboratorios Ordesa	Velactin (Sanutri)	Damira
Peptinaut Junior (Nutricia; Almirón)	Prosobe	Elemental
Nieda Plus (Abbott Laboratories)	(Enfalac/Mead&Johnson)	(Sanutri)
Pregestimil (Enfalac/Mead & Johnson)	Nutribén soja (Alter;	Neocate (SHS)
Alfaré (Nestlé)	Nutribén)	Neocate
Damira 2000 (Sanutri)	Isomil (Abbott)	Advance (SHS)
Damira Atopy (Sanutri)	Som 1 y 2 (Milupa)	
Almirón Pepti con Immunofortis (Nutricia; Almirón)	Nutrisoja (Nutricia;Almirón)	
Nutramigen 1 y 2 (Enfalac/Mead & Johnson)	Blemil 1 y2 soja (Ordesa)	
Nutribén Hidrolizada (Laboratorios Alter; Nutribén)	Blemil 1 y 2 arroz (Ordesa)	
Damira (Sanutri)	Miltina soja (Milte Milk Technologies)	
LactoDamira 2000 (Sanutri)		

Cuando a un lactante se le diagnostica APLV y es alimentado con alguna de las fórmulas anteriormente mencionadas, debe realizarse una valoración y seguimiento nutricional pues, además de tener que evitar la sintomatología clínica, habrá que

asegurar un desarrollo pondero estatural adecuado y evitar las deficiencias de determinados nutrientes. La valoración nutricional comprende (*Dalmau et al., 2008*):

- Valoración de la dieta: Saber qué volumen de fórmula ingiere y en el caso de niños con alimentación complementaria realizar un recuerdo dietético para saber si la dieta es equilibrada o deficitaria en algunos nutrientes.
- Somatometría: Peso, talla, relación peso-talla y la curva pondero-estatural.
- Exploración física: Búsqueda de signos de deficiencias nutricionales.
- Exámenes complementarios nutricionales: Hemograma, bioquímica sanguínea nutricional (albúmina, prealbúmina, ferritina, sideremia, calcio, fósforo, fosfatasas alcalinas).

Aunque el principal tratamiento de la APLV es la lactancia materna durante al menos los 4-6 primeros meses de edad, o en su defecto las fórmulas diseñadas para tales casos, en ocasiones es también necesario un tratamiento farmacológico con pomadas y corticoides o antihistamínicos orales (*Agostoni et al., 2007*).

Prevención de la APLV

En la Tabla 9 se resumen algunas recomendaciones para la prevención de las enfermedades atópicas en niños de alto riesgo.

Tabla 9. Recomendaciones para la prevención.

Recomendaciones para la prevención de enfermedades atópicas
1º Lactancia Materna al menos durante los 6 primeros meses de vida
2º Fórmulas extensamente o parcialmente hidrolizadas (si no es posible lactancia)
3º Evitar el humo del tabaco desde el embarazo. Evitar animales

Las fórmulas parcialmente hidrolizadas (FpH) contienen concentraciones de proteína intacta entre 100-1000 veces mayor que las FeH y que provocan reacciones adversas en la mayoría de pacientes APLV (*Zeiger, 2003*). Se caracterizan por contener un mayor rango de péptidos superiores a 8.000 Da.

Algunos autores defienden la utilización de estas fórmulas en la prevención de la APLV y otras atopías para inducir tolerancia oral (*Fritsche et al., 1997*), pero aún existen controversias acerca de la capacidad de estas fórmulas para promover el desarrollo de tolerancia. Se han encontrado tres meta-análisis publicados en los últimos años sobre el papel que ejercen las FpH de suero proteico. Todos ellos concluyen que este tipo de fórmulas son más eficaces en la prevención de alergias, especialmente la dermatitis, en comparación con las fórmulas estándares, pero siempre prevalece el papel en la prevención con la lactancia materna exclusiva (*Osbon y Sinn, 2006; Szajewska y Horvath, 2009; Alexander y Cabana, 2010*).

Algunos de los resultados más interesantes son los derivados del estudio 'German Infant Nutrition Study (GINI)', donde 2.252 niños con alto riesgo de enfermedad atópica fueron reclutados y aleatoriamente clasificados en 4 grupos distintos en las pautas de alimentación: fórmula extensamente hidrolizada de suero, fórmula extensamente hidrolizada de caseína, fórmula parcialmente hidrolizada de suero y fórmula con proteína de leche de vaca. El periodo de seguimiento de los niños reclutados se prolongó hasta seis años; se demostró un efecto preventivo, a largo plazo, sobre las manifestaciones alérgicas y dermatitis atópica en niños alimentados con fórmula parcialmente hidrolizada de suero y en niños alimentados con la fórmula extensamente hidrolizada de caseína (*von Berg et al., 2008*); Este efecto preventivo sobre la dermatitis atópica persiste hasta los 10 años de edad, aunque no hay suficiente evidencia para continuar con los efectos preventivos en las enfermedades alérgicas (*von Berg et al., 2013*).

Tolerancia

La tolerancia oral consiste en la hiporespuesta sistémica inmunológica que se produce tras la administración oral de antígenos y permite al lactante ingerir alimentos sin presentar reacción adversa inmunológica (*Dalmau et al, 2008*). Las proteínas lácteas ingeridas van a ser normalmente degradadas por la acción de los ácidos gástricos y las enzimas digestivas. Después de la exposición de la mucosa intestinal a los antígenos de la LV, las células presentadoras de antígenos (APCs) interaccionan con las células B y T sub-epiteliales. Las células T y B activadas de los

folículos migran por el sistema linfático y circulan hasta varios órganos del sistema gastrointestinal, respiratorio y piel. Si no se logra la tolerancia, las células B y T se activan, dando lugar a un aumento de la respuesta inflamatoria en los órganos diana, resultando en las manifestaciones clínicas de la APLV (Figura 13) (Fiocchi et al., 2010). La APLV, se manifiesta en localizaciones distintas a donde ha tenido lugar la sensibilización original en el intestino; esto pone de manifiesto que la migración de células es crucial para la patogenia de la enfermedad.

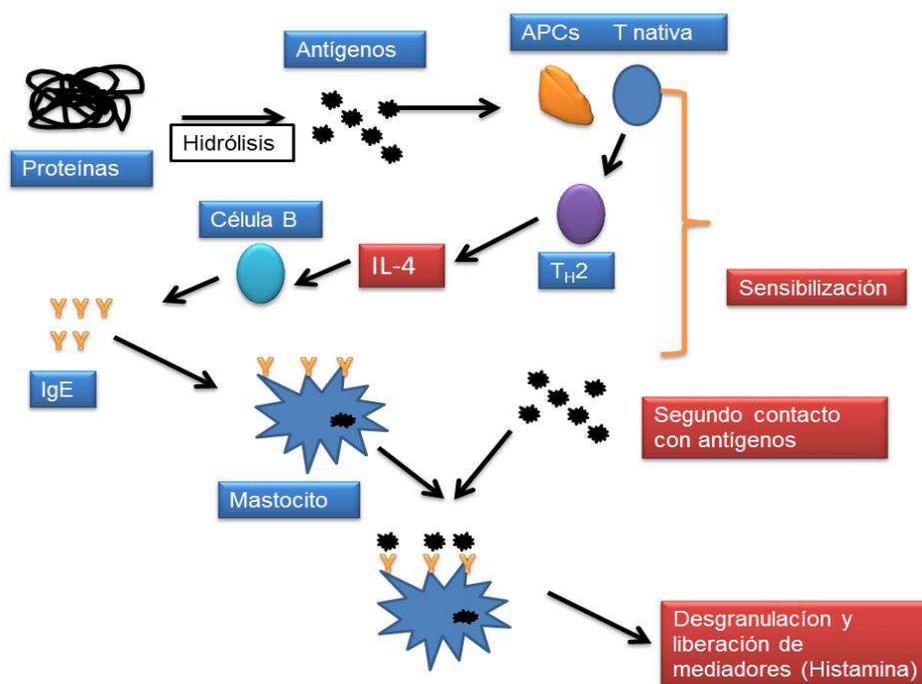


Figura 13. Mecanismo de reacción alérgica a las PLV. (Adaptada de Villoslada, 2005)

El mecanismo exacto de adquisición de tolerancia hacia las PLV es aún desconocido. El sistema inmunitario innato también participa modulando la respuesta inmune adaptativa hacia las PLV, a través de las DCs y los receptores Toll like (TLRs), los cuales influyen en la respuesta T reguladora (Treg) mediante un mecanismo aún desconocido. Las células Treg promueven la tolerancia a los antígenos de la leche mediante la producción de citocinas tolerogénicas (IL-10 y TGF- β). Estas citocinas potencian a su vez la generación de células T reguladoras y promueven en el linfocito B la producción de IgA en lugar de IgE, inhibiendo de esta manera la generación de procesos inflamatorios. Altas concentraciones de IgA secretora específica parecen disminuir la penetración del alérgeno, sensibilización y desarrollo

de alergia. IL-10 y TGF- β son también transferidas a través de la leche materna, poniendo de manifiesto la importancia de la leche materna en el correcto desarrollo del sistema inmunitario (*Piirainen et al., 2009*).

Las células presentadoras de antígenos (APCs), células que inducen la activación y proliferación de las células T, son las que tienen un mayor impacto en la inducción de tolerancia. Además estas células, las DCs de la mucosa intestinal presentan unas características funcionales distintas a las DCs del bazo. DCs de las placas de Peyer, pero no del bazo, expresan RNAm para TGF- β y promueven la producción por T_H2 de IL-4 e IL-10 y pueden ser exclusivamente inducidas para secretar altos niveles de IL-10, que es el modulador de la respuesta tolerogénica (*Spiekermann y Walker, 2001*).

La APLV es el resultado de un fallo en el desarrollo normal del proceso tolerogénico. En el caso de la APLV mediada por IgE, la activación de las células T_H2 conduce a la producción de IgE específica. En el caso de la APLV no mediada por IgE, la alergia se puede deber a una respuesta T_H1. En ambos casos, la disminución de la actividad de las células Treg se ha identificado como factor determinante de la alergia y en niños con historial de APLV el desarrollo de la tolerancia se asocia con una regulación de la respuesta Treg (*Fiocchi et al., 2010*).

Desensibilización o inducción de tolerancia en casos de APLV persistente

En algunos casos se observa que niños mayores de 2 años no son capaces de alcanzar tolerancia a la PLV. Tras los 5 años de edad parece difícil la adquisición espontánea de tolerancia a la. Esta sensibilización puede ser observada incluso en adultos. En estos casos el tratamiento más común es la supresión de la leche de la dieta. Sin embargo, esta práctica es complicada debido a la cantidad de alimentos en el mercado que pueden contener leche o proteínas de leche en su listado de ingredientes o incluso presencia por contaminación cruzada en alimentos libres de leche. La desensibilización o inducción de tolerancia puede ser una alternativa para aquellos niños que no han alcanzado la tolerancia de manera espontánea. En los

últimos años, la investigación clínica se dirige hacia la inmunoterapia: inducción de tolerancia oral específica (SOTI), cutánea (SCIT) o sublingual (SLIT).

En cuanto a la inmunotolerancia oral específica, SOTI en sus siglas inglesas, se ha puesto de manifiesto la capacidad de crear tolerancia a la LV en niños con APLV mediada por IgE, mayores de 2 años. La inducción se ha provocado mediante la administración de dosis incrementadas de LV durante varios días en las unidades de alergología del hospital. Una vez que no observan síntomas cutáneos, respiratorios o digestivos los sujetos son animados a consumir 200 ml de leche diaria, registrando la aparición de síntomas por los padres. Después de un año de seguimiento, el 90% de los casos adquieren tolerancia y se observa una disminución significativa en el SPT frente a LV y en los niveles de IgE específica a LV y caseína en plasma respecto a los valores iniciales (*Martorell et al., 2011*). Otro estudio ha mostrado la eliminación de la sensibilización en el 70% de los casos estudiados, logrando tolerancias de 200 ml al día de LV. La tolerancia inducida mediante este método perdura en el tiempo (*Meglio et al., 2004; Meglio et al., 2008*). Este método parece bastante efectivo en el tratamiento incluso de casos severos (*Longo et al., 2008*).

Los pros de este mecanismo son la seguridad frente a una ingesta accidental de la proteína láctea y la mejora de calidad de vida. Los contras son la necesidad de regular la ingesta y los posibles problemas a largo plazo (*Staden et al., 2007*). Sin embargo, la guía DRACMA, publicada por WAO, no recomienda a los especialistas la aplicación de la inmunoterapia oral en pacientes con APLV mediada por IgE, a no ser que sea en el contexto de una investigación clínica, basándose en una alta probabilidad de evitar efectos adversos asociados a la SOTI y baja probabilidad de alcanzar la tolerancia a la leche (*Fiocchi et al., 2010*). Recientemente un estudio realizado en España ha puesto de manifiesto que la inducción de tolerancia oral a la APLV es un método eficaz, se logra la tolerancia pero no está exento de posibles efectos adversos graves en individuos cuyos niveles de IgE son elevados (*García et al., 2013*).

Validación de fórmulas terapéuticas

En la actualidad, la composición nutricional de las fórmulas terapéuticas, destinadas a la nutrición de lactantes y niños con APLV, no está sujeta a ninguna directiva específica. Por esta razón se tiene en cuenta el cumplimiento de la *Directiva 2006/141/CE* relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación, donde queda establecida la composición nutricional. Además, se considera la Directiva 89/398/CEE relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados miembros sobre los productos alimenticios destinados a una alimentación especial y las recomendaciones de organismos científicos para cumplir los criterios de aseguramiento de la reducción de alergenicidad. La validación las fórmulas hipoalergénicas destinadas al tratamiento de la APLV comprende lo siguiente (Figura 14) (*ESPGAN et al 1993; Scientific Committee on Food, 1993; Host et al., 1999, Committe on Nutrition 2000*):

- Caracterización físico-química (distribución de pesos moleculares, perfil de aminoácidos, análisis químico).
- Aseguramiento de la reducción de antigenicidad.
- Ensayos clínicos con lactantes diagnosticados con APLV (valoración de la antigenicidad y valoración nutricional)

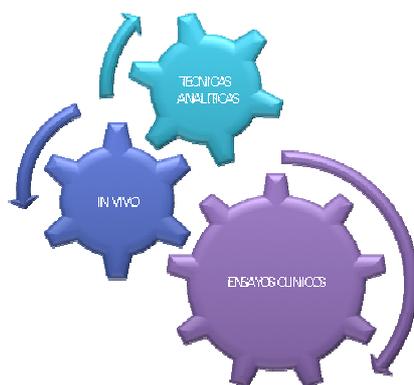


Figura 14. Esquema de los ensayos para la validación de fórmulas hipoalergénicas.

Caracterización físico-química del producto

La composición nutricional de las fórmulas hipoalergénicas se ajustarán a lo establecidos en la *Directiva 2006/141/CE* referente a fórmulas de inicio y

continuación (Tabla 10). Es de vital importancia asegurar que las fórmulas proporcionan cantidades seguras y adecuadas de todos los nutrientes, además de asegurar su capacidad para ser utilizadas en el tratamiento de la alergia (*Hernell and Lönnnerdal, 2003*). Esta consideración es de crucial importancia pues se han observado casos de hipocrecimiento en niños que siguen una dieta exenta en PLV (*Seppo et al., 2005; Isolauri et al., 1998*), así como aportes insuficientes de energía, calcio, e incluso signos bioquímicos de nutrición inadecuada (*Moreno et al., 2006*). En la guía DRACMA se indica qué parámetros nutricionales de una fórmula deberían ser valorados por el pediatra cuando planifica una dieta especial para el tratamiento de la APLV (Tabla 11) (*Fiocchi et al., 2010*).

Tabla 10. Composición básica de los preparados para lactantes (Dir 2006/141/CE)

Directiva 2006/141/CE			
Energía	100 ml	Kcal	60-70
Nutrientes			100 kcal
Equivalente proteico		g	1.8-3
Grasas		g	4.4-6
	Ac. linoleico	mg	300-1200
	Ac. α -linolénico	mg	Min. 50
	Ac. araquidónico	mg	
	Ac. docosahexaenoico	mg	
Hidratos de Carbono		g	9-14
	Lactosa	g	Min 4.5
Minerales			
Sodio		mg	20-60
Potasio		mg	60-160
Cloro		mg	50-160
Calcio		mg	50-140
Fósforo		mg	25-90
Relación Ca/P			1-2
Magnesio		mg	5-15
Hierro		mg	0.3-1.3
Cinc		mg	0.5-1.5
Cobre		μ g	35-100
Yodo		μ g	10-50
Manganeso		μ g	1-100
Selenio		μ g	1-9
Vitaminas			
Vitamina A		μ g	60-180
Vitamina D		μ g	1-2.5
Vitamina E		mg	Min 0.5
Vitamina K		μ g	4-25
Vitamina C		mg	10-30
Vitamina B1		μ g	60-300
Vitamina B2		μ g	80-400
Biotina		μ g	1.5-7.5
Ác. Pantoténico		μ g	400-2000
Micronutrientes			
L-carnitina		mg	Min 1.2
Taurina		mg	Max 12
Inositol		mg	4-40
Colina		mg	7-50
AMP		mg	Max 1.50
CMP		mg	Max 2.50
UMP		mg	Max 1.75
GMP		mg	Max 0.50

Tabla 11. Parámetros nutricionales a evaluar en una fórmula en la planificación de una dieta especial para el tratamiento de APLV. (Adaptada de Fiocchi et al., 2010.)

Parámetros nutricionales relevantes	
Equivalente proteico g/l	Vitaminas
Aminoácidos	Minerales
AA esenciales / Total de AA %	Nucleótidos
Distribución de Pesos Moleculares	Otros nutrientes
Aminoácidos libres /100 g proteína	Taurina, Carnitina, Inositol, Histidina,
Carbohidratos g/l: Glucosa, fructosa, sacarosa, lactosa, galactosa, maltosa, oligosacáridos, FOS, GOS, inulina, maltodextrinas, manosa, almidón, fibra total	Nutrientes funcionales: Probióticos (género, especie, ufc/g polvo) Lactoferrina
Lípidos g/l: saturados, monoinsaturados, MCTs, CLA, trans, total ω -3, ALN, ETE, ETA, EPA, DPA, DHA, total ω -6, AL, γ AL, ARA, fosfolípidos totales, acidograma	Información calórica Kcal/l Desde Carbohidratos % Desde proteínas % Desde lípidos % Desde fibra %
Carga renal potencial del soluto mOsm/l Osmolaridad mOsm/l Osmolalidad mOsm/kg	Indicaciones de la etiqueta: Edad desde la que se puede utilizar el producto Fuente proteica y procesado tecnológico de la misma Fuente de carbohidratos Fuente de lípidos Formulación (líquido o polvo)

- El **equivalente proteico** es importante desde un punto de vista cuantitativo y cualitativo. Cuantitativamente debe estar dentro de los rangos establecidos en la directiva, con el fin de cubrir los requerimientos proteicos del lactante. Cualitativamente debe contener los aminoácidos esenciales y semiesenciales y a las concentraciones mínimas indicadas en la Directiva. Está permitida la adición de aminoácidos como ingredientes en las fórmulas infantiles de inicio y continuación, siempre y cuando el motivo sea alcanzar el contenido establecido en el *anexo V* de la Directiva, con el fin de garantizar los niveles encontrados en leche materna (ESPGHAN, 2005; Directiva 2006/141/EC). Tanto la cantidad como la calidad proteica son parámetros importantes para asegurar el correcto crecimiento y el tratamiento de la enfermedad (Fiocchi

et al., 2010). El equivalente proteico y la calidad proteica varía en función de la fuente empleada en la formulación (hidrolizados de caseína, suero, caseína-suero, arroz, soja...). Distintos hidrolizados de LV han sido utilizados en fórmulas infantiles, siendo distintos su contenido total (Tabla 12) así como la composición relativa de aminoácidos y su biodisponibilidad (ESPGHAN, 2005).

Tabla 12. Contenido proteico en fórmulas hidrolizadas terapéuticas.

Contenido proteico	Fórmulas de inicio	Fórmulas de continuación
Directiva 2006/141/CE	1,8-3	1,8-3,5
Alfaré (Nestlé) (Hidrolizado)		2,95
Althéra (Nestlé) (Hidrolizado)		2,46
Sanutri (Damira Atopy) (Hidrolizado)		2,46
Nutramigen (MeadJonhson) (Hidrolizado)	2,79	2,5
Pregestimil (Mead Jonhson)		
Neocate (Nutricia) (Elemental)		2,71
Blemil Plus Arroz ((Ordesa) (Hidrolizado)	2.39	2,89

- El **aminograma de la fórmula** es uno de los indicadores de la calidad proteica de la proteína. El aminograma debe ser semejante al de la proteína de referencia, la leche materna (*Directive 2006/141/EC; ESPGHAN 2005; SCF 2003*).
- La **distribución de pesos moleculares en la fórmula terapéutica**, además de caracterizar físico-químicamente al producto, aporta información sobre la presencia de alergenicidad residual. Los productos destinados al tratamiento nutricional de sujetos con APLV deben contener péptidos de peso molecular inferior a 3.000 Da. Pesos moleculares inferiores a 200 Da corresponderán a aminoácidos libres y pesos moleculares superiores a 3000 Da a peptonas, proteosas y proteínas. Conforme aumenta el peso molecular aumenta la alergenicidad del producto (*Greer et al., 2008*). La distribución de pesos moleculares nos permitirá detectar si, tras el proceso de fabricación de los hidrolizados proteicos que incluyen etapas tales como proteólisis,

tratamiento térmico, ultrafiltración e incluso aplicación de altas presiones, han sido eliminados los fragmentos proteicos antigénicos; no solo las PLV, sino también todos aquellos agregados que se pueden generar tras la hidrólisis y desnaturalización térmica. (*Restani et al., 1995; Restani et al., 2004; Penas et al., 2006; Monacci et al., 2006; Fiocchi et al., 2010*).

Los tratamientos tecnológicos también pueden generar cambios en las estructuras de las proteínas lácteas. En el caso de la α -lactoalbúmina bovina se ha comprobado que, después de someterla a un tratamiento térmico de 100°C durante 10 minutos, aumentaban los polímeros conformacionales y todos ellos son capaces de unirse a los anticuerpos IgE (*Restani et al., 2004*). También se ha comprobado que durante los tratamientos industriales las proteínas lácteas, concretamente la β -lactoglobulina, se pueden oxidar dando lugar a agregados de aminoácidos oxidados que pueden ser responsables de la formación de nuevas estructuras inmunológicamente reactivas (*Fenaille et al., 2005*).

- El **contenido de nitrógeno no proteico** (fracción de nitrógeno soluble sobre nitrógeno total en ácido tricloroacético) es un parámetro ampliamente utilizado en la caracterización de los hidrolizados. Precipitan las proteínas y polipéptidos, permitiendo este parámetro poder relacionar el grado de hidrólisis con el contenido de nitrógeno soluble. A mayor grado de hidrólisis mayor será el porcentaje de nitrógeno soluble (no proteico).
- El **porcentaje de aminoácidos libres** es importante en la caracterización de este tipo de fórmulas. Está estrechamente relacionado con parámetros como la osmolalidad y la carga renal de solutos. Un elevado contenido en aminoácidos libres no es recomendable, pues hace que estas fórmulas puedan ser hiperosmóticas y puedan provocar secreción intestinal y diarrea; además se ha comprobado que los dipéptidos y tripéptidos se absorben mejor que los aminoácidos a nivel intestinal (*Daniel, 2004*).

- La **osmolalidad** mide la concentración en miliosmoles por kilo de disolvente y es un dato muy relevante en este tipo de productos. A veces se emplea otra medida para la concentración de solutos, la osmolaridad, que representa el número de miliosmoles por litro de disolución. La *Academia Americana de Pediatría* recomienda que las fórmulas infantiles no superen una osmolalidad de 400 mOsm/kg (AAP, 1976). En este tipo de fórmulas el grado de hidrólisis y el tipo de hidratos de carbono (lactosa, glucosa, maltodextrinas) son factores determinantes de la osmolalidad de la fórmula; así pues una fórmula extensamente hidrolizada de suero, que contiene 52% de lactosa y 48% de maltodextrinas, posee una osmolaridad de 302 mOsm/l mientras que el mismo hidrolizado, formulado con maltodextrinas como única fuente de hidratos de carbono, posee menor osmolaridad, 195 mOsm/l. Los hidrolizados proteicos utilizados en las fórmulas para lactantes con APLV deben contener un bajo contenido de aminoácidos, pues aumentan el sabor amargo y la osmolalidad de la fórmula, y un alto contenido en di y tripéptidos, que son fácilmente absorbibles en el intestino (AAP, 1976; Boza et al., 1994). Si la osmolalidad del alimento es muy elevada puede tener lugar un flujo masivo de líquido del intersticio hacia la luz intestinal, con posibilidad de producir una diarrea osmótica y trastornos vasculares en la pared. En condiciones normales, la osmolalidad urinaria es mínima con la lactancia materna y más de 3 veces superior en la alimentación con LV (Ziegler y Fomon, 1989)
- La **carga renal de solutos (CRS)** depende del contenido en sodio, potasio, cloro, fósforo y proteínas (Fomon y Ziegler, 1995) y representa la suma de todos los solutos que debe excretar el riñón (componentes no metabolizados de la dieta, electrolitos en exceso y productos de excreción). En lactantes menores de tres meses hay una capacidad limitada de concentración renal de solutos. El balance hídrico depende del ingreso de agua, la carga renal de solutos, la pérdida extrarenal de agua y la capacidad de concentración renal. Si se ingiere una sobrecarga osmótica elevada y no se administra agua suficiente la excreción de solutos por el riñón dará un balance hídrico negativo (Arguelles, 2003). Los riñones del

recién nacido se caracterizan por una baja tasa de filtración glomerular y una capacidad de concentración limitada. Ambas son suficientes cuando la alimentación aporta suficiente cantidad de agua libre y una baja carga renal de solutos, como es el caso de la leche materna. Sin embargo, la ingesta de LV no diluida o de fórmulas concentradas, en los primeros meses de vida, puede producir alteraciones del equilibrio hidroelectrolítico y ácido-base que resulten en hiperosmolaridad, hipernatremia, acidosis metabólica y en algunos casos hiperfosfemia e hipocalcemia. La capacidad funcional renal aumenta rápidamente en los primeros meses, preparando al niño para el inicio de alimentos con mayor carga de solutos. Los componentes de la leche no contribuyen igual a la CRS y a la osmolalidad. Los hidratos de carbono contribuyen a la osmolalidad y no a la CRS, mientras que las proteínas, por su gran tamaño, contribuyen mínimamente a la osmolalidad y sí contribuyen a la CRS al formar urea y productos de excreción. Las proteínas hidrolizadas a aminoácidos si contribuyen a la osmolalidad del producto.

- El **contenido lipídico** debe encontrarse, al igual que el contenido proteico, dentro de los rangos establecidos en la *Directiva 2006/141/CE*; de esta manera aseguramos un aporte de ácidos grasos acorde con los encontrados en la leche materna, y en las proporciones adecuadas, de manera que la ruta de síntesis de los ácidos grasos esenciales no se vea alterada (*ESPGHAN, 2005*). La adicción de ácidos grasos polinsaturados de cadena larga AGPI CL ω -3 y ω -6 está contemplada y permitida en las disposiciones legales aplicables (Tabla 10). Además de los efectos demostrados que ejercen el DHA y el ARA en la agudeza visual y desarrollo cognitivo (*Agostoni, 2008; Hoffman et al., 2009*), estudios realizados en los últimos años defienden el papel de los AGPI-CL en la disminución de la respuesta inflamatoria y su posible utilización en la prevención y tratamiento de alergias (*Gottrand, 2008; Gil et al., 2010*).
- La **lactosa** es el principal carbohidrato de la leche materna (55-70 g/l). Es fuente de energía, favorece la absorción de agua, sodio y calcio y presenta

efectos prebióticos. Además es fuente de galactosa para la formación de galacto-cerebrósidos. La mayoría de las fórmulas para el tratamiento de niños con APLV han sido diseñadas sin lactosa por dos razones:

- La posible contaminación de la lactosa con restos de proteína (De Goicoechea et al., 2006; Comité de Nutrición de AEP, 2001; Fiocchi et al., 2003)
- La existencia de sintomatología común (diarrea), en niños con APLV y niños con intolerancia a la lactosa (Fiocchi et al., 2003).

El principal inconveniente de la utilización de lactosa fue el posible arrastre de proteínas séricas que puedan desencadenar reacciones alérgicas en niños sensibilizados. Este hecho provocó su exclusión de las fórmulas especiales para niños con APLV. Recientemente se ha logrado obtener lactosa purificada, cuya ausencia de alergenicidad se ha demostrado en ensayos de laboratorio y estudios clínicos controlados (De Goicoechea et al., 2009; Niggemann et al., 2008).

Verwimp y col. 1995, realizaron un ensayo clínico con lactantes menores de 4 meses de edad, con intolerancia a las PLV, a los que les fue administrada durante dos meses y medio una fórmula sérica altamente hidrolizada sin lactosa frente a la misma fórmula con un 40% de lactosa no observándose diferencias significativas entre ambos grupos. Además en el año 2003, Fiocchi y colaboradores publicaron los resultados de un test de provocación controlado doble ciego (DBPCFC), realizado en 24 niños con APLV y de edades comprendidas entre los 2 y 27 meses de edad, en el que se evalúa la tolerancia a la lactosa. No se observaron síntomas en ningún paciente tras la provocación con la lactosa procedente de leche.

Hoy en día muchos pediatras continúan considerando mejor la ausencia de lactosa en las fórmulas para niños con APLV pues, en la IPLV puede existir una atrofia de las vellosidades intestinales con disminución de la actividad lactasa (Tormo y Martín, 2010). ESPGHAN recomienda el uso de productos libres de lactosa, o con lactosa purificada, para eliminar cualquier proteína residual (Host et al., 1999). Sin embargo, la restricción de la lactosa es

una práctica rutinaria para la que no se encuentra una justificación clínica clara (Fiocchi et al., 2003).

- El **contenido en calcio** es un dato analítico relevante pues, al igual que la vitamina D, su ingesta deficiente puede conducir a la aparición de raquitismo, hecho observado en aquellos casos en los que se ha aplicado una dieta exenta de productos lácteos y no se ha asegurado una correcta ingesta de calcio a través de la alimentación complementaria (Noimark y Cox, 2008). La ingesta adecuada de calcio es de 200 mg/día en el caso de lactantes de 0-6 meses de edad y 260 mg/d de 6-12 meses de edad (Institute of Medicine, 2010).
- El **contenido en hierro** se debe ajustar a los valores establecidos en la Directiva 2006/141/CE (Tabla 10). Al igual que en los lactantes sanos, en lactantes con APLV se debe aportar hierro para prevenir y tratar la anemia ferropénica. Deficiencias en hierro pueden aparecer en relación a una desnutrición proteica y en desnutridos en recuperación nutricional. En niños alimentados con una fórmula extensamente hidrolizada de caseína se observó que la absorción de hierro era menor que en el grupo de niños alimentados con un hidrolizado de suero (Hernell y Lönnerdal, 2003). Se han observado casos de anemia en lactantes con APLV cuyas madres limitan la alimentación complementaria para evitar aparición de síntomas (Noimark y Cox, 2008).
- El **contenido de vitamina D**, al igual que el resto de vitaminas, ha de estar dentro del rango establecido por la directiva. Es muy importante asegurar un correcto aporte de vitamina D a todos los lactantes y en especial a los lactantes con APLV, pues se han observado algunos casos de lactantes con APLV con deficiencias de vitamina D y consecuentemente raquitismo (Huang et al. 2000; Davidovits et al. 1993; Yu et al. 2006; Agostoni et al., 2007). Además, recientemente se ha observado cómo la deficiencia de vitamina D podría ser también causante de alergias alimentarias (Vasallo y Camargo, 2010; Searing y Leung, 2010). La ingesta adecuada diaria de vitamina D para lactantes de 0-12 meses de edad es de 400 UI/d (Institute of Medicine, 2010).

Evaluación Nutricional

En 1993, el comité de nutrición de la comisión europea (SCF) redacta un informe donde se describen las condiciones que deben cumplir las fórmulas infantiles para alegar hipoalergenicidad y ser recomendadas para el tratamiento nutricional de niños con APLV; dicho informe destaca la importancia de demostrar la eficacia nutricional de este tipo de fórmulas mediante test clínicos diseñados de acuerdo a protocolos reconocidos (SCF, 1993). Dicho comité propone que todas aquellas fórmulas cuya fuente proteica no haya sido aprobada para su uso, o se hayan aplicado procesos tecnológicos que puedan afectar la biodisponibilidad proteica, deberían ser testadas mediante ensayos clínicos adecuados antes de su comercialización (SCF 2003). La evaluación nutricional de este tipo de productos puede realizarse mediante técnicas analíticas en el laboratorio, ensayos *in vivo* con animales y, finalmente, la valoración mediante un ensayo clínico con lactantes diagnosticados (Figura 14).

Técnicas analíticas - evaluación nutricional

La calidad nutricional de una proteína (o una fuente proteica) es la capacidad que tiene para cubrir los requerimientos de nitrógeno y aminoácidos de un determinado individuo.

- El **índice químico** es uno de los parámetros indicadores de la calidad proteica. El índice químico de las fórmulas elaboradas a partir de hidrolizados proteicos debe ser al menos el 80% de la proteína de referencia (SCF 1993; SCF 2003). Este índice se calcula como la proporción más baja entre la cantidad de un aminoácido esencial en la proteína de la fórmula que estamos testando y el mismo aminoácido encontrado en la proteína de referencia (leche materna) (SCF 2003). Mediante el índice químico podemos conocer cuál es el aminoácido limitante en la fórmula.
- El **aminograma** nos indica la cantidad de aminoácidos esenciales y semi-esenciales presentes en la fuente proteica seleccionada. El contenido de

estos aminoácidos debe ser al menos igual al contenido encontrado en la proteína de referencia para un mismo valor de energía (SCF 1993; SCF 2003; ESPGHAN 2005). Este requisito deben cumplirlo todas las fórmulas infantiles destinadas a la alimentación del lactante (SCF 2003; ESPGHAN 2005; Directive 2006/141/EC).

El valor nutricional de una proteína puede verse afectado por su propia composición de aminoácidos, la hidrólisis y el tratamiento térmico, especialmente por la presencia en estos productos de vitamina C, hierro y lactosa. Durante el tratamiento térmico se pueden originar productos de las reacciones de Maillard (lisinoalanina, furosina, hidroxmetilfurfural) que disminuyen la biodisponibilidad de los compuestos nitrogenados (SCF 2003; Martínez y Martínez 2006). Por esta razón, parece importante conocer el perfil aminoacídico de los hidrolizados antes y tras la fabricación de la fórmula, con el fin de añadir los aminoácidos deficientes y aquellos que durante el tratamiento térmico se puedan deteriorar (SCF 1993).

La mayoría de fórmulas extensamente hidrolizadas comercializadas proceden de caseínas o de suero (Tabla 13), alejándose en tales casos bastante su perfil aminoacídico del de la leche materna. Una combinación adecuada de proteínas extensamente hidrolizadas de caseína y suero, con el fin de acercar el perfil aminoacídico al de la leche materna, parece la estrategia más adecuada (Hernell and Lönnnerdal, 2003).

Tabla 13. Relación caseína: suero en fórmulas extensamente hidrolizadas.

Fórmula	Tipo de hidrolizado de proteínas lácteas
Alfaré (Nestlé)	Suero
Althéra (Nestlé)	Suero
Profylac	Suero
Almirón Pepti (Nutricia)	Suero
Nutramigen (MeadJohnson)	Caseína
Alimentum (Abbott)	Caseína
Damira 2000 y atopy (Sanutri)	Caseína
Damira (Sanutri)	Suero: Caseína 60:40
Blemil Plus FH (Ordesa)	Suero: Caseína 60:40

Ensayos in vivo de los hidrolizados- evaluación nutricional

Los índices más utilizados para evaluar la calidad proteica son:

- Digestibilidad verdadera (CDV)
- Valor biológico (BV)
- Utilización neta de la proteína (NPU).
- Coeficiente de eficacia en crecimiento (PER).

Todos ellos utilizan ratas en crecimiento y evalúan la ganancia de peso por gramo de proteína ingerido (PER). El VB valora el nitrógeno retenido frente al absorbido e informa sobre la utilización metabólica, teniendo en cuenta su aprovechamiento digestivo. El NPU valora el nitrógeno retenido frente al ingerido teniendo en cuenta la utilización digestiva y metabólica respectivamente, pues informa de la proteína ingerida y retenida que es utilizada (*Martínez y Martínez 2006; Olza et al., 2008*). Las principales críticas a estos métodos se basan en los diferentes requerimientos en aminoácidos de la rata y el hombre (*SCF 2003*). En el hombre predominan los procesos de mantenimiento respecto al crecimiento; en ratas, los requerimientos de aminoácidos azufrados son mayores para sustentar el crecimiento del pelo (*SCF 2003; Martínez y Martínez 2006*).

Existe un método AOAC para la determinación del coeficiente de eficacia en crecimiento (AOAC 960.48). Las proteínas y sus derivados como los hidrolizados proteicos que demuestren un valor biológico (BV) superior a 70% y una proporción de eficiencia de proteína (PER) mayor a 2.5 se consideran fuentes adecuadas de nitrógeno amino para nutrición humana (*Acta Paediatric 1977*).

Ensayo clínico- evaluación nutricional

En el tratamiento de la APLV del lactante, tan importante es evitar las reacciones alérgicas como conseguir un adecuado crecimiento; es necesario alcanzar un

desarrollo pondero-estatural adecuado y evitar deficiencias de determinados nutrientes, pues coincide con el periodo de máximo crecimiento en peso y talla y de mayor vulnerabilidad nutricional. Deben hacerse sistemáticamente valoraciones y seguimientos nutricionales de los lactantes alérgicos que reciben fórmulas de sustitución hipoalergénicas (*Dalmau et al., 2008*). Existen numerosos ensayos clínicos en los que se ha investigado el crecimiento en lactantes con APLV alimentados con distintas fórmulas y, en general, todas las fórmulas garantizan un adecuado desarrollo nutricional (*Seppo et al., 2005; Agostoni et al., 2007; Reche et al., 2010*). También se ha observado en algunos ensayos clínicos deficiencias en la ingesta de energía, grasa, proteína, calcio, vitaminas D y E en niños con APLV y/o con una dieta exenta de productos lácteos (*Henriksen et al., 2000*), dirigiéndose en algunos casos a problemas de crecimiento (*Agostoni et al., 2007*) o malnutrición severa (*Novembre et al., 2003; Carvalho et al., 2001*).

Isolauri y colaboradores (Isolauri et al., 1998). Sostienen que la causa de la disminución del crecimiento en lactantes con APLV puede deberse a que la cantidad de nutrientes ingerida es inferior a la ingerida por lactantes sanos, como consecuencia de un estado inflamatorio del intestino. Otra causa puede ser el mal sabor de estas fórmulas que conducen a una baja ingesta y deficiencia global de calorías, proteínas y micronutrientes (*Dalmau et al., 2008*).

El comité de nutrición de la comisión europea propone que, además de evaluar la antigenicidad de las fórmulas, se debería demostrar la eficacia nutricional de la fórmula mediante un ensayo longitudinal con al menos 20 lactantes nacidos a término, evaluando el peso y altura durante al menos 3 meses (*SCF 1993*).

El estado de nutrición del niño está estrechamente relacionado con su salud, permitiendo conocer su potencial de crecimiento y desarrollo. La evaluación del estado nutricional debe incluir:

1. Anamnesis nutricional (historia médica y dietética).

2. Examen físico incluyendo antropometría.

3. Exámenes de laboratorio.

1. En la **anamnesis nutricional** deben considerarse datos como peso y talla del nacimiento y la edad gestacional. La omisión de la edad gestacional es un error frecuente que conduce a un diagnóstico erróneo de desnutrición en niños que están creciendo adecuadamente, pues la prematurez es un factor frecuente de error y conduce a un diagnóstico de desnutrición en niños que están creciendo correctamente.

1. En la **historia clínica** es importante incluir datos sobre la duración de la lactancia, edad de introducción de lactancia artificial, total de fórmula recibida en el día, introducción de alimentos no lácteos, impresión de la madre acerca del apetito del niño, antecedentes familiares (registro de enfermedades crónicas, hereditarias, dedicación profesional de los padres, etc...). Es importante incluir también los antecedentes personales (información referente al parto, gestación, enfermedades padecidas, cumplimiento de medidas terapéuticas), perfil de desarrollo o curva de crecimiento. En el caso de los lactantes, la menor variabilidad de la dieta facilita la obtención de datos que reflejan la ingesta habitual. Sin embargo, la información proporcionada por la madre no siempre es precisa. La anamnesis nutricional es de gran ayuda en la evaluación nutricional, pero no se puede formular un diagnóstico sólo con los datos del historial dietético.

2. En el **examen físico**, los signos clínicos de desnutrición proteica suelen ser de aparición tardía e inespecíficos, observándose en la piel, ojos y boca. La presentación clínica de la desnutrición depende del tipo de carencia. Si la carencia es de energía, el niño pierde masa corporal gradualmente, mientras que si la carencia es proteica la aparición clínica será menos avanzada pero con edemas y signos carenciales graves, propios de la hipoproteïnemia.

- La *antropometría* informa de las dimensiones corporales y la composición corporal; es una de las técnicas más usadas en la evaluación nutricional, proporcionando información acerca del aporte

de macronutrientes. Los parámetros antropométricos más utilizados en lactantes son peso, talla y perímetro craneal. Estas mediciones permiten hacer una valoración somática y su variación indicará cambios en el estado nutricional. Las mediciones deben ser seriadas, efectuadas por personal cualificado con instrumentos adecuados y comparadas con estándares de referencia mediante percentiles o calculando la puntuación Z (*Planas et al., 2010*). Los percentiles nos indican qué porcentaje de la población de la misma edad y sexo se encuentran por arriba o por debajo de la medición efectuada, correspondiendo el P₅₀ a la mediana; por su parte, la puntuación Z expresa las unidades de desviación estándar de la mediana (*Planas et al., 2010*).

- El *peso* permite valorar la masa corporal, informando por tanto del estado nutricional. Se mide con un pesa-bebés (precisión de 10 g) y su valor se obtiene con el niño desnudo colocado sobre el centro de la báscula.
- La *talla* valora la dimensión longitudinal y se ve alterada en la desnutrición crónica. Se emplea el tablero de medición horizontal que mide la longitud del niño con precisión de 0,1 cm. El lactante se sitúa sobre el tablero colocado en una superficie plana, en posición decúbito supino. La talla también debe expresarse en función de la edad siendo un parámetro susceptible a errores de medición por lo que debe ser repetida. Se acepta como normal una talla entre el percentil 10 y 90 para la edad.
- La *combinación de peso-talla* proporciona una evaluación más precisa, muy útil para detectar precozmente la desnutrición aguda.
- El *perímetro craneal* permite valorar el desarrollo volumétrico del sistema nervioso central. Se mide con una cinta métrica inextensible con precisión de 1 mm, pasando la cinta alrededor de la cabeza.
- Los *patrones de crecimiento (tablas de crecimiento)* representan la distribución de una medida antropométrica en una población,

reflejando su estado nutricional. Son herramientas muy útiles para el seguimiento longitudinal y la detección de riesgo nutricional. Las últimas Tablas de crecimiento publicadas en España son las Tablas de Carrascosa y col. 2008, donde se puso de manifiesto la tendencia a la obesidad infantil. Por este mismo motivo no parece recomendable utilizarlas para hacer comparaciones, pues se trata de una población sobrenutrida. Sin embargo, las Tablas de crecimiento de la *Organización Mundial de la Salud* (WHO, 2006) incluyen datos (peso, longitud, perímetro craneal, perímetro del brazo, pliegues tricipital y subescapular, cálculos de la relación peso/talla y del IMC), de niños de 0 a 5 años de edad, alimentados con lactancia materna, procedentes de diversos países del mundo. Los datos se presentan en forma de tablas y gráficos de percentiles y puntuación Z.

3. En la **valoración bioquímica** (Tabla 14) se utilizan como marcadores nutricionales las concentraciones plasmáticas de las proteínas de transporte sintetizadas en el hígado (albúmina, transferrina, prealbúmina, proteína ligada al retinol), como medición indirecta de la masa proteica corporal.
- La concentración de proteínas séricas refleja el ingreso de nitrógeno, asociándose la disminución de sus niveles a la presencia de desnutrición y aumento de morbilidad (*Planas et al., 2010*)
 - La albúmina sérica, índice de evaluación de las proteínas viscerales, refleja bien el estado de la síntesis proteica. No es un buen marcador de cambios nutritivos agudos debido a su largo tiempo de vida media (18-20 días) y su gran pool corporal. En el caso de las APLV, donde puede existir enteropatía con pérdida de proteínas, puede detectarse una disminución de la albúmina plasmática.
 - La transferrina es una proteína transportadora de hierro, de vida media más corta (8-10 días) y pequeño pool plasmático; por tanto de mayor sensibilidad, permitiendo identificar cambios agudos en el estado nutricional. Su concentración aumenta en situaciones de

deficiencia de hierro e hipoxia y disminuye en las infecciones crónicas y enteropatías.

- El hematocrito y la hemoglobina sirven para diagnosticar la carencia de hierro y el calcio para evaluar la sospecha de raquitismo.

Tabla 14. Valores normalizados de la bioquímica del estado nutricional de 1 a 12 meses de edad. (Adaptada del Manual de Pediatría, 2008).

Prueba	Valor numérico
Proteínas	
Sangre	
Albúmina sérica g/dl	≥ 3
Transferrina mg/dl	170-250
Prealbúmina mg/dl	4-2 mg/dl
Proteína fijadora de retinol mg/dl	2-3
Nitrógeno ureico en sangre mg/dl	7-22
Orina	
Índice creatinina/altura	> 0.9
Vitaminas	
Vitamina A	
Retinol plasmático ug/dl	≥ 30
Proteína fijadora del retinol plasmático mg/dl	2-3
Vitamina D	
25-OH-D3 ng/ml	≥ 20
Riboflavina B2	
Estimulación de la glutatión reductasa de los hematíes %	<20
Folacina B9	
Folato sérico ng/ml	> 6
Folatos en los hematíes ng/ml	>160
Vitamina K	
Tiempo de tropombina s	11-15
Vitamina E	
α- tocoferol plasmático mg/dl	≥0.7
Hemolisis de hematíes %	≤ 10
Vitamina C en plamsa mg/dl	
	> 0.2
Tiamina B1	
Estimulación de la transcelotasa de los hematíes %	> 15
Vitamina B12 sérica pg/ml	
	≥ 200

Tabla 14 Continuación. Valores normalizados de la bioquímica del estado nutricional de 1 a 12 meses de edad. (Adaptada del Manual de Pediatría, 2008).

Minerales	
Hierro	
Hematocrito %	33
Hemoglobina g/dl	> 12
Ferritina sérica ng/ml	> 10
Hierro sérico µg/dl	> 40
Capacidad total de fijación del hierro sérico µg/dl	350-400
Saturación de la transferrina sérica %	> 12
Transferrina sérica mg/dl	170-250
Protoporfirina eritrocitaria µg/dl de hematíes	< 75
Cinc	
Cinc sérico µg/dl	80-12
Cinc eritrocitario	10 veces más que cinc en plasma

Evaluación de antigenicidad

Las fórmulas destinadas al tratamiento nutricional de niños con APLV, deben ser testadas antes de su comercialización (SCF 1993, Comité de Nutrición de AAP, 2000; ESPGAN et al., 1993). En el informe del comité de nutrición de la comisión europea, se indican los métodos que deben ser utilizados para verificar la hipoadergenidad de las fórmulas (SCF 1993):

- Propiedades moleculares del hidrolizado.
- Valoración de la reducción de antigenicidad de la proteína con respecto a la proteína nativa mediante técnicas analíticas y ensayos *in vivo* con animales

Sin embargo, posteriormente se observa por los resultados de ensayos clínicos publicados que la efectividad clínica no se puede predecir únicamente con la

determinación del grado de hidrólisis y la alergenicidad residual (SCF 2003). Actualmente el potencial de un producto para el tratamiento de lactantes con APLV debe ser demostrado mediante la realización de un ensayo clínico, debiendo ser tolerando el producto por el 90% de los lactantes con APLV con un intervalo de confianza del 95% (Host et al., 1999; AAP 2000; Fiocchi et al., 2010).

Técnicas analíticas – evaluación de antigenicidad

Aunque existe un amplio abanico de técnicas analíticas para la detección de proteínas de la leche, la bibliografía sobre la detección de proteínas específicas de la leche en productos alimenticios a bajas concentraciones es relativamente escasa (Monaci et al., 2006). Los métodos generalmente aceptados a los que hace mención la Directiva 2006/141/CE son (Host et al., 1999; SCF, 1993; Monaci et al., 2006; Host y Halcken 2004):

- Métodos analíticos (inmunológicos “ELISA test, RAST, RAST inhibicion test, inmunolectroforésis”, determinación del ADN de alérgenos alimentarios mediante PCR, electroforesis capilar, cromatografía, etc..)
- Métodos *in vivo* (SPT, test de provocación).

La distribución de pesos moleculares, así como la determinación de alergenicidad mediante técnicas ELISA test, pueden ser herramientas útiles dentro del control de calidad de los productos y del aseguramiento de la reducción del contenido de proteína lote por lote (Host y Halcken, 2004).

Las técnicas ELISA, ensayo inmunoabsorbente de unión a una enzima, han demostrado ser sensitivas y específicas para la detección de PLV, aunque ninguno de los kits comerciales disponibles han sido validados por estudios colaborativos (Monaci et al., 2006). Tanto las proteínas como sus epítomos de unión a IgE pueden ser determinados mediante técnicas ELISA directas o competitivas utilizando anticuerpos del suero de pacientes alérgicos o de animales (Fritsché, 2003)

En la técnica de inmunodifusión en agar, el antígeno y el anticuerpo difunden a través de un agar y en caso de correspondencia forman en su recorrido complejos antígeno-anticuerpo que se visualizan al originar bandas de precipitación. No es una técnica cuantitativa.

En inmunoelectroforésis el antígeno es sometido a una electroforesis en un gel que contiene el anticuerpo.

La electroforésis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, SDS-PAGE, es una herramienta rápida, simple y muy sensible para la separación de proteínas. Las proteínas se separan en función de su tamaño. Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE pueden ser visualizadas en el gel por tinción con plata y azul de coomassie; de esta manera se puede determinar el peso molecular de las proteínas comparando la muestra con los marcadores (*Docena et al., 2002*).

También son empleados métodos cromatográficos, como la cromatografía líquida de alta resolución con columnas de intercambio iónico o de exclusión por tamaño. La cromatografía de exclusión se basa en la diferencia de penetración de las moléculas de la muestra a través de los poros de la fase estacionaria. Las moléculas son atrapadas en los poros y eliminadas de la fase móvil. Las moléculas que son más grandes que el tamaño medio de los poros son excluidas, no se retienen y son las primeras que eluyen. Las de menor tamaño penetran, por lo que son atrapadas durante más tiempo, siendo las últimas en eluir. Las moléculas de tamaño intermedio, dependiendo de su tamaño y forma, quedan retenidas más o menos tiempo (*Skoog y Leary, 1994*).

Actualmente el abanico de técnicas analíticas para la determinación de proteínas de las fórmulas e hidrolizados es amplio, técnicas novedosas como MALDI-TOF, HPLC-MS, PCR, están siendo hoy en día utilizadas (*Dreger, 2003; Ferranti, 2004*).

Métodos in vivo en animales – evaluación de antigenicidad de los hidrolizados

Mediante pruebas *in vivo* con animales se puede predecir la alergenicidad y tolerancia de las fórmulas infantiles hipoalergénicas (*Boza et al, 1994*). Mediante estas pruebas se comprueba la capacidad sensitiva y anafiláctica de los hidrolizados en animales previamente sensibilizados (*Sanz et al., 2009; Lara-Villoslada et al.,*

2004). Estos ensayos constan de una etapa de inducción, durante la cual el sistema inmunitario del hospedador es sensibilizado por el alérgeno, alcanzando una producción de anticuerpos IgE específicos al antígeno que se unirán a la superficie de los mastocitos; una segunda etapa tiene lugar cuando el alérgeno se une a los anticuerpos IgE de los mastocitos provocando la liberación de histamina. La primera fase corresponde al periodo de sensibilización de los animales y la segunda a la fase de provocación (Figura 13).

La alergenicidad de las PLV se ha estudiado utilizando distintos modelos con animales. Las cobayas parecen ser los animales más sensitivos a las proteínas lácteas y son sensibilizadas oralmente sin utilización de adyuvantes. Existe un inconveniente en la utilización de modelos murinos para el estudio de alergias alimentarias, y es la tendencia innata que tienen a desarrollar tolerancia oral a los antígenos ingeridos (*Fritsché, 2003*).

Ensayo clínico – evaluación de antigenicidad

Dentro de la validación de las fórmulas destinadas al tratamiento nutricional de niños con APLV, y una vez comprobado mediante determinaciones analíticas y ensayos *in vivo* con animales la reducción de alergenicidad y la calidad nutricional de la fórmula en estudio, es requisito indispensable la validación final de la fórmula. Consiste en la comprobación, mediante un ensayo clínico con lactantes diagnosticados con APLV, de que la fórmula objeto de estudio es tolerada por el 90% de la población, con un intervalo de confianza del 95% (*Committee on Nutrition AAP, 2000; Host et al., 1999; Vandenplas et al., 2007; Fiocchi et al., 2010*).

La AAP asume que el ensayo clínico debe ser doble ciego, placebo-control y de provocación (*DBPCFC* en sus siglas inglesas) (*AAP, 2000*). Sin embargo, el comité de nutrición de la comunidad europea (*SCF 1993*) y la sociedad europea de pediatría (*Host et al., 1999*) no lo creen necesario; estos comités consideran que un ensayo abierto con suficiente número de sujetos es más apropiado, pues siempre

son posibles en sujetos altamente sensibilizados la aparición de reacciones agudas. El test DBPCFC es el estándar de oro en el diagnóstico de alergias alimentarias, pero los ensayos abiertos son adecuados en el screening de reactividad, la cual puede ser confirmada por test de provocación ciega particularmente en el caso de síntomas subjetivos (*Sicherer et al., 2004; Nowak-Wegrzyn et al., 2009; Fiocchi et al., 2010*).

Biomarcadores de alergia e inflamación

Los biomarcadores utilizados en el diagnóstico de las alergias pueden también ser utilizados en ensayos clínicos para la validación de la fórmula, aportando una valiosa información sobre el efecto en la evolución y tratamiento de la enfermedad. En el diagnóstico de la APLV mediada por IgE se utilizan, como indicadores de la enfermedad, los niveles en el suero de distintas inmunoglobulinas (IgE total, IgE específica, IgA, IgG...). Estas determinaciones se emplean en el diagnóstico y en el seguimiento o pruebas de tolerancia. En el caso de los lactantes, cuando los valores de IgE total son superiores a 0,35 kU_A/L se confirma la alergia. Las medidas de IgE específica a un alérgeno se realizan mediante test cutáneos o medidas de IgE específica en suero. Estos últimos son muy útiles en el diagnóstico y monitorización de las alergias alimentarias cuando los test cutáneos no pueden ser utilizados (*Stone et al., 2010*).

En el caso de la APLV es bastante usual utilizar en el diagnóstico la prueba cutánea de Prick frente a LV, sus proteínas lácteas (caseínas, lactoalbúmina y β -lactoglobulina), pescado y huevo, complementando la información derivada de estas pruebas con la determinación de IgE total en plasma o IgE específicas. Altos niveles de IgE específica a la LV y fuertes reacciones en el SPT son indicadores de la existencia y la persistencia de la APLV (*Skripak et al., 2007*). Los anticuerpos IgE e IgG₄ reconocen epítomos de la LV similares. IgG₄ induce tolerancia al bloquear la unión de los anticuerpos IgE al alérgeno. En pacientes que adquieren tolerancia a la PLV, se observa un aumento de IgG₄ y una disminución de IgE en plasma (*Savilahti et al., 2010*).

El diagnóstico clínico de la APLV no mediada por IgE se apoya en la detección en heces de otros parámetros inmunológicos (IgA, eosinófilos, TNF- α). La IgA es la inmunoglobulina más abundante en las superficies mucosales y es capaz de neutralizar los antígenos alimentarios y prevenir la penetración en el epitelio de estos y, por lo tanto, participa en la tolerancia oral. Las IgA son producidas por células B maduras. La asociación entre bajos niveles de IgA total e IgA específica con las manifestaciones alérgicas explican la importancia de esta inmunoglobulina en la protección frente a enfermedades alérgicas (*Kukkonen et al., 2010*).

Los eosinófilos son granulocitos cuya presencia en la sangre hace que puedan ser utilizados como marcadores de alergia, asma, desórdenes gastrointestinales, etc. Los eosinófilos liberan mediadores de inflamación cuando son activados. Los contenidos normales en sangre son de 500/mm³. Un aumento de eosinófilos en sangre es típico en las enfermedades alérgicas (*Stone et al., 2010*). La proteína catiónica del eosinófilo (ECP) es otro marcador cuyo contenido en heces de lactantes con APLV se correlaciona con la aparición de síntomas alérgicos. No es un marcador útil en el diagnóstico pero sí en el seguimiento para determinar el desarrollo de tolerancia y el grado de inflamación del intestino (*Saarinen et al., 2002*).

IL-10 es una citocina que se asocia a la maduración de las células T y al desarrollo de tolerancia oral (*Field et al., 2000*); es una citocina inmunosupresora, inhibe la liberación de citocinas pro-inflamatorias; se encuentra en la leche materna, pudiendo contribuir al desarrollo y diferenciación de las células productoras de IgA y la maduración del sistema inmunitario intestinal (*Field et al., 2005*)

TGF- β también está presente en la leche materna bajo la forma de dos isómeros TGF- β 1 y TGF- β 2. La presencia de esta citocina en la leche materna parece estar implicada en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, regulación de la inflamación y alergia, así como en el desarrollo de la tolerancia (*Oddy et al., 2010; Penttila, 2010*). Es la citocina más abundante en la leche materna y es capaz de prevenir una activación excesiva de la respuesta T_H1 y T_H2 y promover una respuesta Treg frente a una exposición de antígenos (Figura 15) (*Penttila, 2010*). Se han observado diferencias en la concentración de TGF- β 1 de leche materna

procedente de madres alérgicas y madres no alérgicas (215 pg/ml, 1059 pg/ml)(*Rigotti et al., 2006*). Estudios con ratones han mostrado como la suplementación de una leche con $TGF-\beta 2$ regulaba la respuesta IgG1 específica para β -lactoglobulina, la IgE total y la activación de los mastocitos mucosales, aumentando las citocinas T_H1 (IL-18, IL-12 e $INF-\gamma$) y la IL-10 (*Penttila, 2006*). Estos resultados apoyan la participación de $TGF-\beta$ en la programación y desarrollo del sistema inmunitario (*Penttila, 2010*).

IL-4, IL-5 e IL-13 son las citocinas típicas de una respuesta linfocitaria T_H2 , cuyos niveles en plasma suelen ser altos en lactantes con APLV. La producción de citocinas T_H2 (IL-4, IL-13) es mayor y menor la producción de IL-10 (*Schade et al., 2000*)

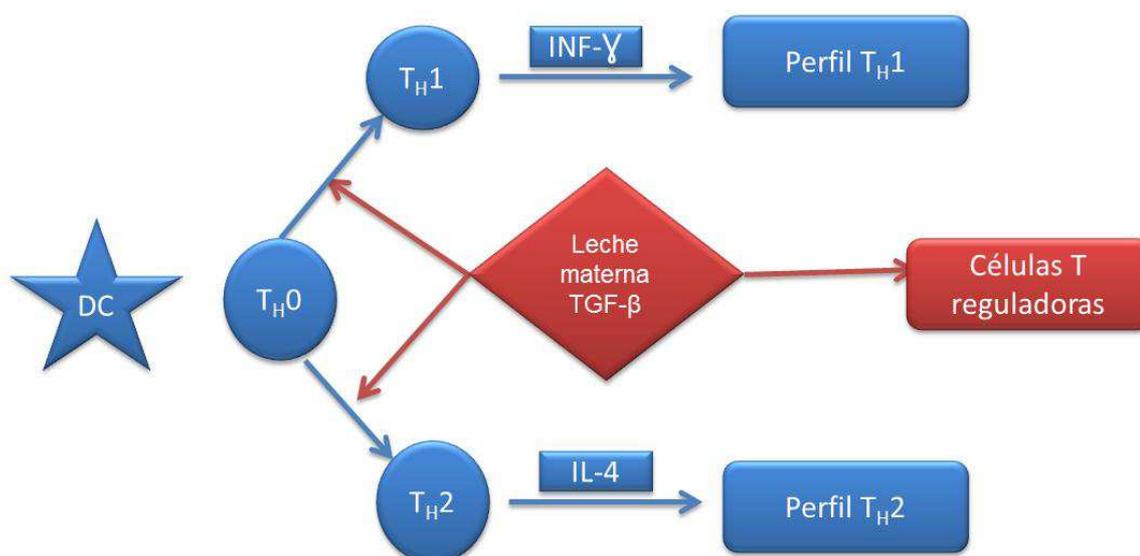


Figura 15. Modulación de la respuesta TH1/TH2 a través de $TGF-\beta$ presente en la leche materna. (Adaptada de Penttila, 2006).

IL-17 genera una respuesta inmune inmediata T mediada hacia patógenos extracelulares (proteínas extrañas). Las citocinas IL-17 son producidas por los linfocitos T_H17 , estando el grupo constituido por 6 proteínas (IL-17A hasta IL-17F) (*Commins et al., 2010*). IL-17A tiene la capacidad de inducir citocinas proinflamatorias (IL-6, $TNF-\alpha$, IL-1 β) y quemoquinas (CXCL1, IL-8, MCP-1) importantes en el reclutamiento de neutrófilos (*Wang y Liu, 2008; Khorn et al.,*

2009); también participa en la respuesta linfocitaria T_H2 (Wang y Liu, 2008). En estudios en ratones, se ha comprobado que la IL-17A contribuye a la activación de linfocitos T_H2 alérgeno específico, acumulación de eosinófilos y producción de IgE. En pacientes asmáticos se observa una correlación entre la hipersensibilidad de las vías respiratorias y la expresión de IL-17A (Wang y Liu, 2008; Ciprandi et al., 2009). IL-25 (IL-17E), al igual que IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, deriva de los linfocitos T_H2 . Estimula la liberación de IL-4, IL-5, IL-13 contribuyendo a la desviación hacia la respuesta T_H2 (Commins et al., 2010).

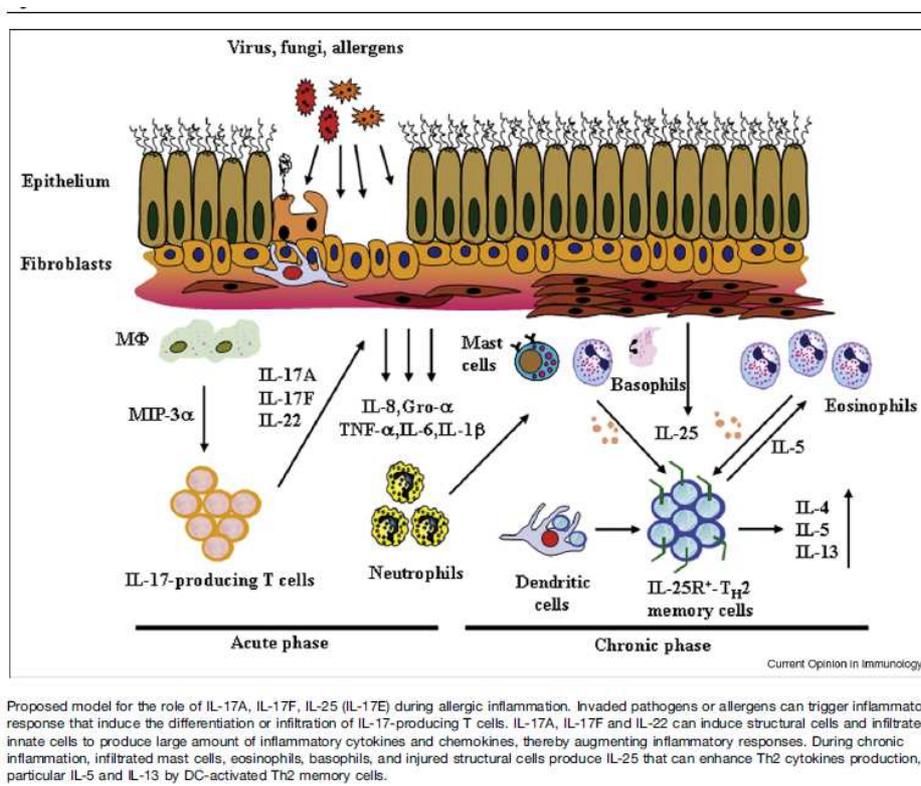


Figura 16. Modelo propuesto para el desarrollo de IL17 durante la inflamación alérgica. (Adaptada de Wang y Liu, 2008).

IL-8 es una citocina proinflamatoria, que se detecta en el plasma de la mayoría de sujetos que padecen dermatitis atópica.

IFN- γ es una citocina representativa de la respuesta linfocitaria T_H1 . En las enfermedades alérgicas existe un desequilibrio hacia la respuesta linfocitaria T_H2 , luego podemos encontrar bajas producciones de esta citocina en linfocitos de sujetos alérgicos (Noh et al., 2012).

TNF- α es una citocina proinflamatoria secretada por las células epiteliales en respuesta a la invasión de patógenos.

α 1-antitripsina (AT) fecal es una herramienta útil, no invasiva, para la detección y seguimiento de la inflamación intestinal en lactantes atópicos. En lactantes sanos se observan concentraciones inferiores a 2 mg/g peso seco en heces. En lactantes con APLV se han observado concentraciones superiores a 3 mg/g antes de someterlos a una dieta de eliminación; posteriormente a la dieta de eliminación, la concentración de AT disminuye significativamente a niveles normales ($p=0.028$), coincidiendo además con una mejoría clínica del eczema atópico e implicando una disminución de la inflamación intestinal. En este estudio solamente se ha encontrado correlación de AT con la APLV (Majamaa et al., 2001).

HNP (péptido de neutrófilos humanos, HNP1-3) y β defensina (HBD2) son también parámetros de inflamación fácilmente medibles en heces. Savilathi et al. han encontrado relación entre bajos niveles de HNP1-3 y altos niveles de HBD2 en las heces de lactantes de 6 meses de edad y la aparición de alergias y sensibilización a los 5 años de edad. Estos marcadores se asocian a una respuesta inmune innata temprana con la aparición de alergias a edades más tardías (Savilahti et al. 2011)

La determinación de parámetros inmunológicos en el diagnóstico constituyen técnicas de apoyo pues, con la aparición de síntomas, el historial clínico y las pruebas de provocación parece suficiente para disponer de un diagnóstico correcto de la enfermedad. Sin embargo, estos parámetros son útiles en los ensayos clínicos, con el fin de profundizar en el conocimiento del desarrollo de la enfermedad y la adquisición de la tolerancia.

Tabla 15. Marcadores de inflamación.

Biomarcadores de alergia e inflamación	
En heces	En sangre, plasma
IgA, IgA específica a LV, TNF- α , IL-10, TGF- β , calcoproteína, α 1-antitripsina, eosinófilos, HNP1-3, HBD2, ECP, otros...	IgA, IgE, IgE específica, IgG...IL-4,IL-6, IL-10, TGF- β , IL-17, TNF- α , otros...

Nuevas estrategias en la prevención y tratamiento de alergias. Ingredientes funcionales

La marcha atópica comienza en la edad temprana y continúa hasta la edad adulta. El desarrollo del sistema inmunitario es bastante vulnerable a los cambios medioambientales y simples estrategias enfocadas en evitar los alérgenos causantes de la enfermedad no parecen ser suficientes. Estas estrategias están siendo retiradas de la mayoría de guías escritas por organismos científicos. De acuerdo a los resultados derivados de estudios, que actualmente están en desarrollo, se podrán incluir en estas guías recomendaciones acerca del uso de ingredientes y la introducción temprana de los alérgenos, para promover la tolerancia. La mejor estrategia para reducir la creciente carga de enfermedades alérgicas es la prevención (*Prescott y Nowak-Wegrzyn, 2011*).

La evolución de la marcha atópica, se podría explicar formulando cuatro hipótesis (Figura 17). Estas hipótesis son consecutivas en el tiempo y se suceden de acuerdo a los cambios socio-económicos experimentados durante las últimas décadas.

Es evidente que se han producido cambios en el estilo de vida que han reducido la exposición microbiana. La "hipótesis de la higiene" fue propuesta por Strachan en 1989 para explicar el aumento de la prevalencia de enfermedades atópicas; Strachan demostró, a partir de datos epidemiológicos, una relación inversamente proporcional entre la prevalencia de rinitis alérgica y el tamaño familiar (*Strachan, 1989*). Esta hipótesis sostiene que un reducido contacto con microbios y la reducción de la carga de enfermedades infecciosas en la edad temprana, conducen a debilitar la respuesta T_H1 y estimular la respuesta T_H2 (*Rautava et al., 2004; Schaub et al., 2009*).



Figura 17. Hipótesis sobre la aparición de las alergias

La elevada prevalencia de enfermedades atópicas en los países industrializados encuentra su primera justificación a través de la "hipótesis de la higiene" pero existe otra hipótesis, relacionada con el elevado consumo de ácidos poliinsaturados de cadena larga ω -6, AGPI-CL ω 6 (Black y Sharpe., 1997; Calder, 2006; Sausenthaler et al., 2006). En estos países se ha producido un aumento del consumo de ácido linoleico (LA 18:2 ω -6) precursor del ácido araquidónico (20:4 ω -6), principal sustrato para la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos de la serie 2 (PG₂, TXA₂) y leucotrienos de la serie 4 (LT₄), mediadores de inflamación en alergias (Calder, 2006). Así pues, PGE₂ disminuye la producción de citocinas tipo T_H1, IL-2, INF- γ , aumenta la producción de citocinas tipo T_H2 como IL4, IL-5 y promueve la producción de anticuerpos IgE por las células B (Prescott y Calder, 2004). PGE₂ es necesario para el funcionamiento normal de las células T, sin embargo a altas concentraciones es inmunosupresor (Gottrand, 2008).

En base a estas observaciones, son numerosos los estudios en los que se trata de lograr un balance en el aporte ω -3/ ω -6. Bajas ingestas de AGPI ω -6 favorecen ciertas funciones inmunes, mientras que altas ingestas las disminuyen. Los metabolitos derivados de AA pueden limitar la inmunidad celular y pueden inducir una respuesta del tipo T_H2 (proalérgica) (Gottrand, 2008). Un aumento en la

proporción de ω_6 hacia ω_3 favorece la respuesta T_H1 , mientras que una disminución en la proporción de ω_6 hacia ω_3 , puede favorecer la respuesta T_H2 (Undurti, 2006). Actualmente hay una preocupación generalizada en base al bajo consumo de EPA y DHA por lactantes y niños de corta edad (Uauy y Dangour, 2009)

Otra hipótesis es la llamada *hipótesis dietética*, basada en los cambios de hábitos alimentarios experimentados en las últimas décadas, caracterizada por un aumento del consumo de grasas saturadas, sal, azúcares refinados y la disminución del consumo de frutas, verduras, fibra, alimentos ricos en antioxidantes y vitaminas (Torres et al., 2012). La hipótesis dietética se sustenta en las diferencias encontradas entre niños que han seguido unos hábitos alimentarios tradicionales (los que viven en hábitat rurales) con respecto a los hábitos en sociedades desarrolladas (Riedler et al., 2001).

En los últimos años, se habla también de la *hipótesis de la vitamina D*. La deficiencia de vitamina D parece estar implicada en el inicio de alergias alimentarias y atopía en la infancia. Recientemente se ha demostrado la implicación de la vitamina D en el desarrollo del sistema inmunitario del lactante y su papel en la prevención de enfermedades atópicas. Otros nutrientes como antioxidantes, ácido fólico están actualmente siendo investigados (Prescott y Nowak-Wegrzyn, 2011)

Actualmente no se conoce ninguna estrategia nutricional efectiva en la prevención terciaria. Son necesarios más estudios longitudinales de intervención nutricional con cohortes de lactantes e incluso madres gestantes (Torres et al., 2012)



Figura 18. Ingredientes Funcionales. Nuevas tendencias en la prevención de enfermedades alérgicas.

AGPI-CL ω -6/ ω -3

Se han observado bajos niveles de ácido docosahexanoico (DHA) y una proporción elevada de AA/EPA en leche materna de madres alérgicas o atópicas y en los fosfolípidos del suero de sus lactantes; estos niveles bajos de DHA se relacionaron con la aparición de alergias a los 18 meses de edad (*Duchen et al., 2000*). Además, dentro del estudio europeo NUHEAL, se ha demostrado cómo la suplementación con aceite de pescado, en madres alérgicas en edad gestacional, se traduce en una disminución de IL-2 e IL-13 en sangre del cordón umbilical, así como un aumento de TGF- β , estando implicado este último, en la tolerancia a los antígenos (*Krauss-Etschmann et al., 2008*). En otro estudio multicéntrico europeo, *Childhood Asthma Prevention Study*, se ha evaluado la suplementación en las primeras etapas de la vida con DHA, en niños con alto riesgo de ser asmáticos, y sus consecuencias a los 18 meses y 5 años de edad. A los 18 meses se observa como la suplementación con DHA y la modificación del balance ω -6/ ω -3 pueden tener efectos positivos en las dificultades respiratorias (*Marks et al., 2006*).

La suplementación con AGPI-CL ω -3 de las fórmulas destinadas al tratamiento nutricional de los lactantes con APLV, y su posible papel en el desarrollo de tolerancia y la modulación del sistema inmunitario, es una línea de investigación novedosa, en las que están trabajando conjuntamente nutricionistas, pediatras y alergólogos (Tablas 16^{a,b,c}).

Tabla 16a. Evidencias científicas de los AGPI-CL en la prevención y tratamiento.

Autores	Objetivo y variables	Conclusiones
<p>Field et al., 2008. Br J Nutr. Ensayo Clínico</p>	<p>Objetivo: Valorar la influencia de una fórmula con AGPI en la capacidad de los linfocitos sanguíneos para proliferar y producir cks en respuesta a un mitógeno (PHA)</p> <p>Niños sanos entre 7-14 días. 3 grupos (leche materna; Fórmula; Fórmula + AGPI). n=16 niños en cada grupo.</p> <p>Variables: Medidas antropométricas (al inicio y a las 4 semanas); Muestras de sangre (al inicio y 4 semanas) hematograma, concentración de AGPI en fosfolípidos, fenotipado de linfocitos, proliferación de linfocitos, producción de cks por los linfocitos. (PHA, phytohaematogglutinin. Utilizado comúnmente para imitar antígenos microbianos)</p>	<p>Fórmula con AGPI-CL (DHA 0.20% y 0.34% ARA). Lactantes alimentados con esta fórmula a las seis semanas de edad presentan una producción de TNF-alfa y tipo de células después de la estimulación con PHA similar a la encontrada en el grupo de lactantes alimentados a pecho.</p> <p>Las diferencias en el tipo de respuesta inmune debido a pequeños cambios en la composición lipídica de las fórmulas puede ser fisiológicamente importante pero requiere más estudios.</p>
<p>Furuhjelm et al., 2009. Acta Pædiatrica Ensayo clínico</p>	<p>Objetivo: Evaluar el efecto de la suplementación con AGPI-CL ω-3 durante el embarazo y la lactancia en el riesgo de sensibilización alérgica y enfermedad durante el primer año de vida.</p> <p>Reclutamiento: 145 mujeres embarazadas (n=70 suplementadas). Seguimiento de 117 niños.</p> <p>Variables: Análisis de AGPI-CL y IgE específica en plasma una semana después del parto. SPT, IgE específica (huevo, pescado, trigo, leche) cuadro clínico, test de provocación en niños a los 3,6, 12 meses de edad.</p>	<p>Suplementación con ω-3 de madres (alérgicas o familiar alérgico) durante el embarazo y lactancia. La prevalencia de alergias alimentarias en niños de madres suplementadas fue menor (1/52) que en el grupo placebo (10/65) a los 6 y 12 meses ($p < 0,05$)</p> <p>Niños de madres no alérgicas (n=37), en el grupo de madres suplementadas el 14% de los niños dio positivo en el SPT y en el grupo placebo el 58% de los niños ($p < 0,05$).</p> <p>No existieron diferencias significativas entre el grupo placebo y suplementado en el caso de niños (n=79) de madres alérgicas en el SPT positivo y reacciones de alergia a alimentos.</p>

Tabla 16b Continuación. Evidencias científicas AGPI-CL en la prevención y tratamiento.

Autores	Objetivo y variables	Conclusiones
<p>Mazurak et al., 2008. JPGN Estudio doble ciego aleatorizado, caso control</p>	<p>Objetivo: Valorar la suplementación con AA y DHA a largo plazo sobre los fenotipos celulares y producción de citocinas</p> <p>Reclutamiento: 37 niños (5-7 años) bajas ingestas de DHA. Período de ingesta 7 meses.</p> <p>Se estudia la relación entre parámetros del sistema inmune y el contenido en DHA y ARA en plasma y eritrocitos.</p> <p>Ensayos ex vivo de proliferación de linfocitos y producción de citocinas frente a mitógenos y alérgenos</p>	<p>En el grupo suplementado, el porcentaje de células CD8⁺ exoresando CD25 y/o CD80 fue significativamente más bajo que en el grupo placebo después de la exposición a β-lactoglobulina.</p> <p>El grupo suplementado presentó proporciones de células CD14⁺ más bajas tras la estimulación con β-lactoglobulina e ibuprofeno.</p> <p>Existe una correlación positiva entre el contenido de DHA en los fosfolípidos y CD25 y CD28 a los 7 meses de consumo.</p>
<p>Krauss-Etschmann et al., 2008. J Allergy Clin Immunol. Ensayo multicéntrico, doble ciego, randomizado, placebo control</p>	<p>Objetivo: Demostrar como la suplementación con aceite de pescado en madres gestantes modula los parámetros inmunológicos relacionados con alergia en madres y su descendencia.</p> <p>Reclutamiento: 315 gestantes, n=77 grupo suplementado, con fólico, con ambos y n=80 grupo placebo.</p> <p>Muestra de sangre de madres y cordón.</p>	<p>La suplementación con aceite de pescado fue asociada con aumento de TGF-β en la madre y cordón umbilical Disminución de IL-1 e INF-γ en la madre. Disminución de IL-13, IL-4, NK en el cordón.</p> <p>La suplementación con aceite de pescado se traduce en una disminución de los niveles de mRNA de las moléculas T_H2 en el feto y disminución de las citocinas inflamatorias en la madre.</p>

Tabla 16c Continuación. Evidencias científicas AGPI-CL en la prevención y tratamiento

Autores	Objetivo y variables	Conclusiones
<p>Duchén et al., 2000. Pediatr Allergy Immunol Estudio prospectivo</p>	<p>Objetivo: Estudiar la influencia de la composición en s-IgA y ácidos grasos ω-3 de la leche materna en el desarrollo de enfermedades alérgicas en niños en los primeros 18 meses de vida.</p> <p>Reclutamiento de 160 madres gestantes atópicas (n=33), alérgicas (n=63) y no alérgicas (n=57). Seguimiento de los niños a los 3,6,12,18 meses de edad.</p> <p>Variables: SPT en madres y niños (6,12,18 meses), hábitos alimentarios de la madre (en el parto, 3 y 6 meses de edad), muestras de sangre a los 3 meses, del cordón umbilical, y de las madres tras el parto. Muestras de leche materna. Medidas de s-IgA contra β-lactoglobulina y OVA y AGPI en leche. Análisis de s-IgA y AGPI en fosfolípidos del plasma.</p>	<p>La leche de madres alérgicas y el suero de sus lactantes presenta contenidos de DHA bajos y ratio AA/EPA elevado.</p> <p>Bajos niveles de DHA se correlacionan con la aparición de alergias a los 18 meses de edad.</p>
<p>Burks et al., 2008. J Pediatr</p>	<p>Fórmula elemental con AGPI-CL (DHA 0.32% y 0.64% ARA) frente a otra fórmula extensamente hidrolizada</p> <p>Estudio 1. Estudio de crecimiento y tolerancia. Niños Sanos con 14 días de vida. DBPC (Durante 4 meses). N=60 niños en cada grupo. Variables: peso, talla, perímetro encefálico, aminograma en sangre (solo en 15 niños de cada grupo); aceptación y tolerancia (consumo de la fórmula 24 horas antes de cada visita y efectos adversos anotados)</p> <p>Estudio 2. Estudio de hipoalergenicidad (7 días) DBPCFC n=32 Niños con APLV (8 meses a 10 años). Variables: reagudización de síntomas.</p>	<p>En el estudio 1 los resultados de crecimiento, tolerancia y seguridad fueron similares en ambos grupos. No existieron diferencias clínicamente relevantes.</p> <p>En el estudio 2, los 29 sujetos que completaron el estudio dieron positivo el SPT para histamina y leche de vaca y negativo para las fórmulas.</p> <p>La adición de DHA puede proporcionar efectos anti-inflamatorios potencialmente beneficiosos para lactantes con APLV y otras alergias. NO EVALUA LA PRESENCIA DE LCPUFA EN LOS ERITROCITOS</p>

Peptidos bioactivos

Las proteínas lácteas contienen en su estructura secuencias de aminoácidos inactivas, capaces de ejercer determinadas actividades biológicas cuando son liberadas durante la digestión gastrointestinal, mediante procesos tecnológicos (enzimáticos, químicos o térmicos) o, incluso, por fermentación microbológica (Korhonen y Pihlanto, 2006). Estas secuencias suelen estar constituidas por péptidos de pequeño tamaño, de 3 a 20 aminoácidos y pueden presentar una o varias de las siguientes actividades: actividad opiácea, antitrombica, antibacteriana, inmunomodulante, antihipertensiva, quelatante de minerales. La fracción proteica de la leche humana, contiene péptidos bioactivos susceptibles a ser liberados durante la digestión gastrointestinal (Tabla 17) (Hernández-Ledesma et al., 2007; Tsopmo et al., 2011).

Tabla 17. Listado de algunos péptidos bioactivos encontrados tras la digestión in vitro de muestras de leche humana.

Fragmento Proteico	Masa Da	Secuencia	Función	Identificado por
β -CN f(125-129)	575,34	HLPLP	Inhibidor ACE	Hernández-Ledesma et al. 2007; Kohmura et al 1989
β -CN f(155-160)	654,37	SVPQPK	Inhibidor ACE	Hernández-Ledesma et al. 2007
α -Lac f(19-26)	768,44	GGIALPEL		Hernández-Ledesma et al. 2007
α -Lac f(95-99)	600,38	ILDIK		Hernández-Ledesma et al. 2007
β -CN f(206-209)	480,51	HNPI		Hernández-Ledesma et al. 2007; Tsopmo et al. 2010
β -CN f(68-73)	596,57	PLAQPA		Hernández-Ledesma et al. 2007; Tsopmo et al. 2010
No identificado	631,35	YGYTGA	Antioxidante (ORAC)	Tsopmo et al. 2010
No identificado	704,34	ISELGW	Antioxidante (ORAC)	Tsopmo et al. 2010

Lawlor y col. han observado en niños con edades comprendidas entre los 9 y 15 años de edad, que habían sido alimentados durante los primeros 6 meses de vida con lactancia materna exclusiva, una presión sistólica más baja que aquellos niños que no habían sido amamantados (Lawlor et al., 2005). La presencia de péptidos

bioactivos antihipertensivos o inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) en la leche materna podría ser una de las razones que justificasen este comportamiento. *Hernández-Ledesma y col.* identifican en muestras de leche humana de distintos periodos de lactancia, péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la enzima ACE. La mayoría de péptidos bioactivos identificados en las muestras de leche materna procedían de la β -caseína; concretamente el fragmento f(125-129) de la β -caseína, secuencia HLPLP, se caracteriza por ser un potente inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina, ACE (*Hernández-Ledesma et al., 2007*).

Los péptidos bioactivos con actividad antioxidante suelen incluir en su secuencia al triptófano. Algunos autores sostienen que, a consecuencia de la capacidad de atrapar radicales libres, la síntesis de estos péptidos podría destinarse al tratamiento nutricional de lactantes con estrés oxidativo o alta producción de radicales libres, como son los lactantes prematuros (*Tsopmo et al., 2011*).

Los péptidos con actividad inmunomoduladora suelen ser fragmentos derivados de la α s1-caseína, de la β -caseína, κ -caseína y α -lactoalbúmina. Se ha observado *in vitro* como pequeños péptidos obtenidos por hidrólisis del suero lácteo estimulan la proliferación de células del sistema inmunitario (*Hernández-Ledesma et al., 2008*). Además, fragmentos derivados de la β -lactoglobulina, obtenidos a partir de digestiones enzimáticas *in vitro* y suministrados a ratones, mejoraron la capacidad fagocítica de los macrófagos peritoneales (*Biziulevicius et al., 2006*) y parece que algunos péptidos bioactivos procedentes de la leche, podrían aliviar las reacciones alérgicas en sujetos atópicos y mejorar la inmunidad de la mucosa en el tracto gastrointestinal. Por lo tanto, en lactantes, estos péptidos inmunomoduladores, podrían estar regulando el desarrollo del sistema inmunitario (*Korhonen y Pihlanto, 2006*).

Los péptidos bioactivos varían en su secuencia aminoacídica, dependiente de la enzima con la cual se produce la hidrólisis. Por esta razón, distintas fórmulas hidrolizadas hipoalergénicas, contendrán distintos péptidos bioactivos.

La identificación y cuantificación de péptidos bioactivos en las fórmulas infantiles hidrolizadas es complicada debido a la complejidad de las muestras; pueden contener cientos de péptidos diferentes y a distintas concentraciones (*Catala et al., 2010*). En las últimas décadas las técnicas aplicadas para la detección de péptidos bioactivos va desde la cromatografía líquida, acoplada a un detector de espectrometría de masas, hasta la electroforesis capilar, acoplada a un detector ultravioleta o a un detector de masas, surgiendo en los últimos años la utilización de los analizadores de tiempo de vuelo (TOF, en sus siglas inglesas) como una de las mejores alternativa. Tras una digestión *in vitro*, se ha observado la presencia en fórmulas hipoalergénicas de péptidos inhibidores de la actividad ACE (*Hernández-Ledesma et al., 2007; Martín et al., 2008*); sin embargo, aún no se ha comprobado su actividad hipotensiva en recién nacidos (*Korhonen et al., 2006; Catalá-Clariana et al., 2010*).

MATERIALES Y METODOS

Diseño Experimental

El objetivo principal de este proyecto fue el diseño de una nueva fórmula hipoalergénica, para el tratamiento nutricional de los lactantes con APLV. Para ello, y como primer paso, fue necesario proceder a la selección de los ingredientes proteicos más apropiados, desde un punto de vista nutricional y antigénico, así como llevar a cabo la correcta formulación de la fórmula terapéutica. El plan de trabajo se estructuró definiendo las siguientes fases consecutivas:



Figura 19. Plan de trabajo

Fase 1. Selección de los hidrolizados proteicos

- Comprobar la reducción antigénica de los hidrolizados.
- Determinar el valor nutricional de los hidrolizados.

Fase 2. Caracterización de la nueva fórmula terapéutica.

- Determinar la reducción antigénica.
- Determinar el contenido en péptidos bioactivos.
- Realizar un ensayo clínico – Seguridad, tolerancia y valor nutricional.

Fase 3. Funcionalidad de DHA y AA en la prevención terciaria.

- Determinación de DHA y AA la membrana de los eritrocitos.
- Determinación de los niveles de citocinas (IL-13, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TGF- β) en plasma.

En el siguiente cronograma se refleja la evolución de este trabajo de investigación (Figura 20) y los grupos de investigación implicados (Figura 21).

	2007		2008				2009				2010 -11				2012			
	Sep-Dec	Ene-Mar	Abril-Jun	Jul-Sep	Oct-Dec	Ene-Mar	Abril-Jun	Jul-Sep	Oct-Dec	Ene-Mar	Abril-Jun	Jul-Sep	Oct-Dec	Ene-Mar	Abril-Jun	Jul-Sep	Oct-Dec	
Selección de Hidrolizados	■																	
Reducción de alergenidad en los	■																	
Valor biológico de los Hidrolizados - <i>in vivo</i>		■																
Prueba de Anafilaxia - <i>in vivo</i>		■																
Diseño y Fabricación de la fórmula terapéutica			■	■	■				■				■					
Ensayo clínico - Protocolo, aprobación comité ético			■	■	■	■	■											
Recrutamiento										■	■	■	■	■	■	■	■	
Análisis															■	■	■	
Resultados										■	■	■	■	■	■	■	■	
Discusión														■	■	■	■	

Figura 20. Cronograma del plan de trabajo

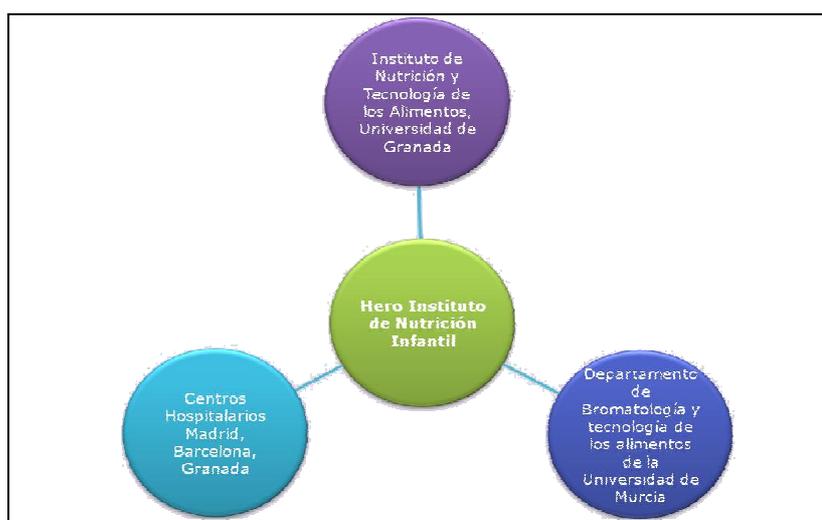


Figura 21. Grupos de investigación implicados en el estudio

Experimento 1. Caracterización antigénica y nutricional de la fórmula.

Caracterización antigénica y nutricional de los hidrolizados

Se seleccionaron dos hidrolizados proteicos, un suero extensamente hidrolizado denominado *WE80BG* y una caseína extensamente hidrolizada, *CE90STL*. Ambos ingredientes fueron suministrados por *DMW International* con sus correspondientes fichas técnicas (Tabla 18).

Tabla 18. Datos relevantes encontrados en las fichas técnicas

	Hidrolizado de suero WE80BG	Hidrolizado de caseína CE90STL
Equivalente proteico %	81.7*	86.7**
Nitrógeno total %	12.3	12.9
pH	6.5	6.9
Humedad %	4.0	5.0
Cenizas %	4.1	6.5
Grasa %	0.1	<0,1
Lactosa %	2.6	<0.1
Carbohidratos totales %	10.1	1.7
Solubilidad g/l	700	300
Grado de hidrólisis %	29	39
Aminoácidos libres %	3	15
ELISA (reducción comparada con proteína nativa)	10 ⁵	10 ⁶
Ca mg/100g	398	40
Mg mg/100g	51	8
K mg/100g	1028	1240
Na mg/100g	1266	1230
P mg/100g	254	830
Fe mg/100g	1	4
Cl mg/100g	90	200

*factor de conversión calculado en función del grado de hidrólisis (NTx6.64); **factor de conversión calculado en función del grado de hidrólisis (NTx6.72)

La caracterización antigénica y nutricional de los hidrolizados se realizó mediante los siguientes ensayos analíticos:

- Distribución de pesos moleculares y peso molecular medio.
- Contenido de proteína inmunoreactiva.
- Valor biológico de los hidrolizados.
- Prueba de anafilaxia en los hidrolizados.

Caracterización de los hidrolizados

Para la determinación de la distribución de pesos moleculares de los hidrolizados proteicos se utilizó una técnica cromatográfica (Ritcher *et al.*, 1983 y Knight *et al.*, 1985) de cromatografía de exclusión por tamaño, con algunas modificaciones. La puesta a punto, desarrollo y validación de este método se encuentran descritas en la tesis de máster, depositada en la Universidad de Murcia en el curso académico 2008-2009 con el título '*Control In Vitro de la reducción de alergenicidad en fórmulas hipoalergénicas preventivas y terapéuticas destinadas a lactantes y niños de corta edad*'.

De manera resumida, el método consistió en reconstituir, tanto los hidrolizados como los estándares, en una concentración de 10 mg/ml en la propia fase móvil (guanidina clorhídrica 6M). Posteriormente fueron homogeneizados, mediante agitación con agitadores magnéticos, en matraces aforados y filtrados posteriormente con filtros de nylon de 0.22 µm. La solución fue recogida en viales de 1.5 ml para su posterior análisis en el equipo de cromatografía, en el que se situaron en serie, dos columnas de exclusión por tamaño, Shodex KW 802.5, de 30 cm de longitud y con un rango de trabajo (100–50000 Da).

El peso molecular medio se calculó a partir de la distribución de pesos moleculares a partir de una media ponderada según el área de cada uno de los picos cromatográficos obtenidos:

$$PM_m = \sum \frac{PM_i A_i}{A_i} \cdot 100$$

PM_m = *Peso molecular medio.*

PM_i = *Peso molecular de un péptido i*

A_i = *Area del peso molecular i.*

De acuerdo a la revisión bibliográfica se consideraron como principales proteínas inmunoreactivas la β-lactoglobulina, proteína mayoritaria del suero lácteo, y la caseína. Se procedió a la determinación de su contenido mediante la utilización de kits ELISA comerciales.

La determinación del contenido de β -lactoglobulina, se realizó mediante un Kit comercial denominado RIDASCREEN® β -lactoglobulina, suministrada por *r-Biopharm*. Este Kit está indicado para la determinación de β -lactoglobulina, nativa y procesada, en alimentos infantiles hipoalergénicos, leches hidrolizadas y leche en polvo, mediante un análisis inmunoenzimático competitivo. Las paredes de los pocillos para el análisis estaban cubiertas por β -lactoglobulina. Se adicionaron a los pocillos los patrones de β -lactoglobulina a distintas concentraciones, las muestras objeto de estudio y los anticuerpos; en el interior de los pocillos se genera una competencia de unión a los anticuerpos entre la β -lactoglobulina fijada en las paredes y la β -lactoglobulina libre, presente en los patrones y/o las muestras. Después de lavar, se adiciona la enzima conjugada peroxidasa, uniéndose ésta a los complejos anticuerpo- β -lactoglobulina. La enzima conjugada libre se pierde en la siguiente etapa de lavado. Se adicionan el enzima sustrato y un cromóforo que tiñe de azul las uniones (anticuerpo)-(β -lactoglobulina)-(enzima conjugada). Posteriormente se adiciona la solución de parada, H_2SO_4 , provocando un cambio de color de azul hacia amarillo. Se midió fotométricamente la absorbancia a una λ de 450nm; la absorbancia es inversamente proporcional la concentración de β -lactoglobulina en la muestra.

La detección y cuantificación de caseína bovina, se realizó mediante otro Kit comercial denominado, BIODATA Casein assay kit, suministrado por *Tepnel*. Dicho kit permite mediante un inmunoensayo enzimático competitivo indirecto, detectar bajas concentraciones de caseína bovina y caseinatos en distintos tipos de muestras. En los pocillos se encuentran fijados los anticuerpos de caseína y existe una reacción de competencia entre la caseína del kit y la caseína presente en la muestra. De nuevo, la concentración de la proteína inmunoreactiva, la caseína, es inversamente proporcional a la absorbancia detectada en el lector de placas.



Figura 22. Esquema procedimiento para la determinación de caseína bovina

Una vez finalizada la evaluación de los hidrolizados, se procedió a la evaluación nutricional y de antigenicidad *in vivo*, de los mismos.

Caracterización in vivo– Valor biológico de los hidrolizados

Para la evaluación nutricional de los hidrolizados se aplicó el método 'AOAC 960.48, Protein Efficacy Ratio. Rat Bioassay. 2002 AOAC International considerado adecuado para la evaluación de la calidad de la proteína. En dicho método se evaluó el incremento de peso frente a la ingesta proteica. La calidad de la proteína de los hidrolizados (CE90STL y WE80BG) se determinó calculando los siguientes parámetros: digestibilidad de la proteína, valor biológico de la proteína, utilización neta proteica y coeficiente de eficacia en crecimiento.

Animales:

27 ratas Wistar macho al destete, 21 días de edad. Las ratas fueron colocadas en jaulas metabólicas individuales, siendo fácilmente determinable la cantidad de comida ingerida por cada animal, así como la orina y heces producidas. La habitación se mantuvo a una temperatura entre 22°C y 24°C, ventilada mediante un extractor de aire y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas.

Dietas:

Dietas isocalóricas con un 12% de proteína. Se utilizaron los hidrolizados en estudio (CE90STL y W80BG) como fuente proteica de dos de las dietas y caseína + 5% DL-metionina como fuente proteica de la dieta control (AIN93). La composición de las dietas así como la de los correctores mineral y metabólico se muestran en las Tablas 19-22.

El ensayo fue aprobado por el comité ético de la Universidad de Granada y llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de esta misma universidad. Se utilizó la técnica de Thomas-Mitchell modificado (*Boza et al., 1994*), empleándose 9 ratas Wistar macho al destete por grupo, alojadas en jaulas metabólicas individuales que permiten la recogida de heces y orina por separado, así como el control del alimento consumido. La orina era recogida sobre una solución de HCl 0,1N, con el fin de fijar todo el amoniaco en forma de cloruro amónico.

Tabla 19. Composición de la dieta durante el período de endógeno (g/100g).

Ingredientes	(g)	Composición química	%
Caseinato cálcico	4.76	Proteína	4.55
DL-Metionina	0.21	Hidratos de carbono	82.40
Aceite de soja	3.85	Lípidos	3.97
Celulosa	8.00	Humedad	6.02
Almidón de maíz	43.97	Cenizas	3.06
Sacarosa	35.48	* Sodio	258
Cloruro de colina	0.10	* Potasio	383
Corrector mineral	5.50	* Cloro	294
Corrector vitamínico	0.03	* Calcio	700
		* Magnesio	45
		* Fósforo	449
		* Hierro	0.6

* Las concentraciones de los elementos minerales están expresadas en mg/100g

Tabla 20. Composición de las dietas durante el período fundamental. Dietas isocalóricas con un 12% de proteína, que diferían en la fuente de ésta proteína.

	CASEÍNA		H. LACTOSUERO		H. CASEÍNA	
	%	g/2 kg	%	g/2kg	%	g/2kg
Almidón de maíz	47,75	955,00	47,75	955,00	47,75	955,00
Proteína	12,00	240,00	12,00	303,22	12,00	283,45
Almidón dextrinado	13,20	264,00	13,20	264,00	13,20	264,00
Sacarosa	10,00	200,00	10,00	168,37	10,00	195,18
Aceite de soja	7,00	140,00	7,00	140,00	7,00	140,00
Fibra (celulosa)	5,00	100,00	5,00	100,00	5,00	100,00
Complejo mineral	3,50	70,00	3,50	70,00	3,50	70,00
Complejo vitamínico	1,00	20,00	1,00	20,00	1,00	20,00
L-cistina	0,18	3,60	0,18	3,60	0,18	3,60
Bitartrato de colina	0,25	5,00	0,25	5,00	0,25	5,00
Tocoferol (mg)	0,0014	0,0280	0,0014	0,0280	0,0014	0,0280
TOTAL	99,88	1997,63	99,88	2029,22	99,88	2036,26

Tabla 21. Corrector vitamínico.

Mezcla AIN-93-VX	mg/100g
Ácido nicotínico	300
Pantotenato cálcico	160
HCl-pridoxina	70
HCl-tirosina	60
Riboflavina	60
Ácido fólico	20
Biotina	2
B-12	250
Vitamina E	1500
Vitamina A	80
Vitamina D ₃	25
Vitamina K ₁	7,5
Sacarosa en polvo	97465,5
TOTAL	100000

Tabla 22. Composición de los hidrolizados

	Hidrolizado de caseína CE90STL	Hidrolizado de lactosuero WE80BG
N total %	12,6	11,92
Ca mg/100g	38,18	55,98
Na mg/100g	1558,5	1185,7
K mg/100g	2302,06	858,71
Mg mg/100g	3,8	61,39
P mg/100g	785,8	330,8
Cl mg/100g	355,91	156,65
Fe mg/100g	2,75	1,9

En el transcurso de la experiencia se consideraron dos periodos (Figura 23):

- Periodo endógeno de 5 días de duración, de los cuales los 2 primeros días fueron de adaptación a la dieta, determinándose en los tres restantes el nitrógeno fecal y urinario.
- Periodo experimental de 10 días de duración, siendo los 3 primeros días de adaptación a la dieta mientras que en los siete restantes se controlaron la ingesta y se recogieron la orina y las heces. Diariamente se determinó la cantidad de comida que toma cada rata y cada dos días las ratas fueron pesadas, recogiendo las heces y la orina de cada una de ellas.

La dieta administrada durante el período endógeno fue igual a la dieta con proteína patrón (caseína + 5% DL-metionina) pero, en este caso, al 4% en proteína, concentración ésta que se considera límite para que no exista depleción proteica y los contenidos de nitrógeno en heces y orina durante este periodo no se deriven del alimento ingerido, sino de las descamaciones, enzimas liberadas en intestino, etc., permitiéndonos así el cálculo real de la digestibilidad, valor biológico y utilización neta proteica de los hidrolizados.

Durante el periodo experimental, los 3 grupos de animales recibieron las dietas con un 12 % de proteína.

Grupo 1: dieta control con caseína.

Grupo 2: dieta con hidrolizado extenso de caseína (CE90STL).
 Grupo 3: dieta con hidrolizado extenso de suero (WE80BG).

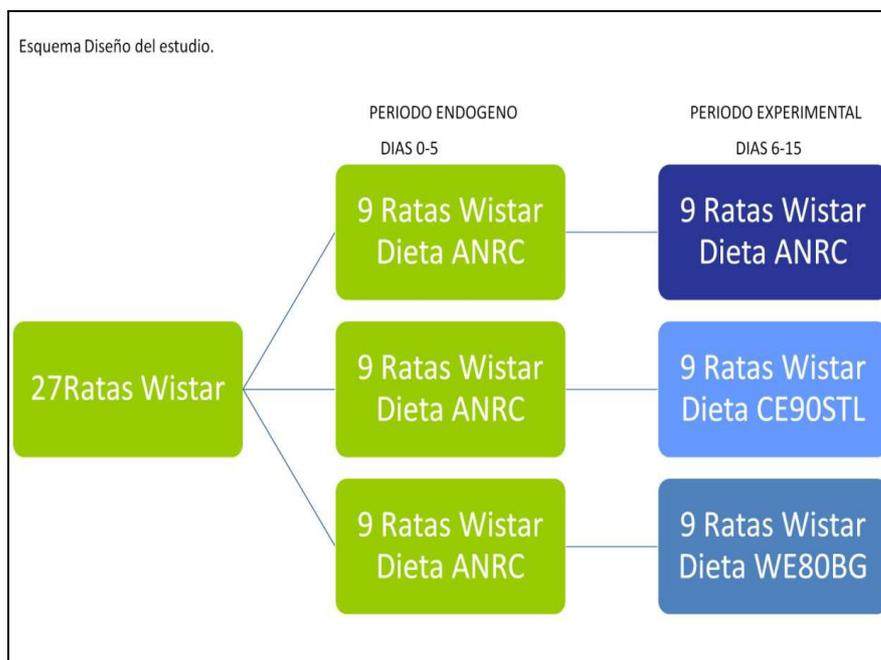


Figura 23. Diseño experimental de la caracterización *in vivo*- Valor biológico de los hidrolizados.

Procesado de las muestras:

Los valores de nitrógeno en orina y heces fueron determinados en base al método de Kjeldahl (AOAC 1990) como se describe a continuación.

Muestras de orina:

Debajo de cada jaula metabólica se colocó un dispositivo que permitía la recogida de la orina y las heces de cada rata, formado por un recipiente de plástico que contiene ácido bórico al 4% para evitar que se evaporase el amoníaco de la orina; además se añadió como indicadores rojo fenol, que en pH ácido es amarillo y en pH básico es rojo transparente, y verde de bromotimol que es verde en pH básico. Sobre el dispositivo de recogida de orina y heces se situó un cono de plástico que lleva papel de filtro encima y a la vez el papel se pone en contacto con el ácido bórico; este sistema permite que se mantenga la capilaridad, permitiendo la recogida de la orina. Cada dos días la orina de cada rata se recogía en un vaso de precipitados (Figura 24).



Figura 24. Recipientes para la recogida de orina y heces.

Tratamiento de las muestras de orina:

El contenido de orina en cada vaso de precipitados se filtró en un matraz aforado y se enrasó hasta 500 ml con ácido bórico. Posteriormente, el nitrógeno de las proteínas se determinó mediante el método Kjeldahl (AOAC 1990).

Muestras de heces:

Al igual que la orina, las heces fueron recogidas cada dos días, gracias al dispositivo explicado anteriormente que permitía que las heces chocasen con el cono de plástico y se recogiesen en el recipiente. Estas fueron almacenadas en bolsas de plástico y congeladas a -20°C hasta su procesado.

Tratamiento de las heces:

Las heces recogidas durante los siete días se colocaron en placas petri y fueron liofilizadas para eliminar el contenido de agua. Tras la liofilización fueron pesadas, trituradas y sometidas a congelación. Las cápsulas para la determinación se introducían en una estufa a 100°C durante 24 horas y posteriormente se colocaban durante 15 minutos en el desecador. Estas eran pesadas, se añadían 0,5 g de muestra y colocadas de nuevo en la estufa a 100°C .

Transcurridas 24 horas, se pesaba la sustancia seca y se introducía en un tubo de digestión, para realizar la determinación de nitrógeno por el método Kjeldahl

(AOAC 1990) procediendo de la misma forma que se realizó en las muestras de orina.

Muestras de las dietas:

Se determinó el contenido de nitrógeno de cada una de las dietas por cuadruplicado. Se procedió de igual manera que en las muestras de heces y orina, es decir mediante el método Kjeldahl.

Cálculos:

Los índices de calidad nutricional de las proteínas se calcularon según las siguientes fórmulas:

Coeficiente de digestibilidad verdadera (CDV):

$$CDV = \frac{N_{\text{absorbido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100 = \frac{(I - (F - Fe))}{I} \times 100$$

Valor biológico de la proteína (VB):

$$VB = \frac{N_{\text{retenido}}}{N_{\text{absorbido}}} \times 100 = \frac{(I - (F - Fe) - (U - Ue))}{(I - (F - Fe))} \times 100$$

Utilización neta de la proteína (NPU):

$$(NPU = CDV \times VB \times 100)$$

$$NPU = \frac{N_{\text{retenido}}}{N_{\text{ingerido}}} \times 100 = \frac{(I - (F - Fe) - (U - Ue))}{I} \times 100$$

Coeficiente de eficacia en crecimiento (PER):

$$PER = \frac{\text{Incremento...Peso...Animal(g.)}}{\text{Proteína...ingerida(g.)}}$$

Siendo:

I = Nitrógeno
ingerido (mg/día)

F = Nitrógeno en heces (mg/día)
 Fe = Nitrógeno en heces durante el periodo endógeno (mg/día)
 U = Nitrógeno en orina (mg/día)
 Ue = Nitrógeno en orina durante el periodo endógeno (mg/día)

Caracterización in vivo- Prueba de anafilaxia sistémica con los hidrolizados

La capacidad antigénica de los hidrolizados (CE90STL y WE80BG) se evaluó analizando la respuesta anafiláctica a nivel sistémico. Esta prueba se llevó a cabo con el fin de determinar las características terapéuticas y profilácticas de los hidrolizados, en animales de experimentación. La administración del hidrolizado en animales previamente sensibilizados, frente a la presencia de proteínas en su forma nativa, debía evitar la aparición de choque anafiláctico. Por otra parte, la administración de proteínas en forma nativa por vía intravenosa no debía tener consecuencias fatales en animales a los que se ha administró previamente el hidrolizado por vía oral.

Los animales seleccionados fueron cobayas macho (200-250 gramos de peso) de la raza *Dunking-Hartey*. 42 cobayas fueron colocados en jaulas suficientemente amplias para albergar a 2-3 animales y permitir una alimentación *ad libitum*. Las jaulas se dispusieron en una habitación mantenida a temperatura constante 22-25°C, con ciclos de luz-oscuridad de 12 horas. Estos animales tomaron una dieta para cobayas carente de proteínas lácteas (Tabla 23).

El ensayo fue aprobado por el comité ético de la universidad de Granada y llevado a cabo en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de esta misma universidad.

Tabla 23. Dieta para cobayas.

Composición química		Unidades
Proteína	19.53	%
Hidratos de Carbono	11.70	%
Grasas	3.3	%
Cenizas	8.29	%
Vitamina A	12000	UI/kg
Vitamina C	3000	mg/kg
Vitamina D3	1400	UI/kg
Vitamina E	60	UI/kg

Los animales fueron separados en 5 grupos (Figura 26):

- Grupo A (2 animales), recibió agua.
- Grupo W (10 animales), recibió una solución de un concentrado de proteínas de lactosuero (35 mg/ml).
- Grupo WH (10 animales) tomaron una solución del hidrolizado de proteínas séricas lácteas (WE80BG) en una concentración equivalente de proteína de 35 mg/ml.
- Grupo C (10 animales) recibió una solución de un concentrado de proteínas de caseína (35 mg/ml).
- Grupo CH (10 animales) recibió una solución del hidrolizado de caseína (CE90STL)(35 mg/ml).

El protocolo seguido fue el siguiente (Figura 25):

- Días 1-15: Los animales ingirieron la misma dieta sólida y las diferentes soluciones líquidas según el grupo al que pertenecieran, período considerado suficiente para provocar una inmunización por vía oral.
- Días 16-21: todos los animales tomaron la dieta sólida y bebieron agua.
- Día 22: Se realizó la prueba de anafilaxia sistémica.

Los reactivos utilizados para la prueba de anafilaxia, fueron:

- Éter.
- Solución salina (NaCl 0.9%).
- Proteínas nativas (caseína y suero).
- Hidrolizados (CE90STL y WE80BG).

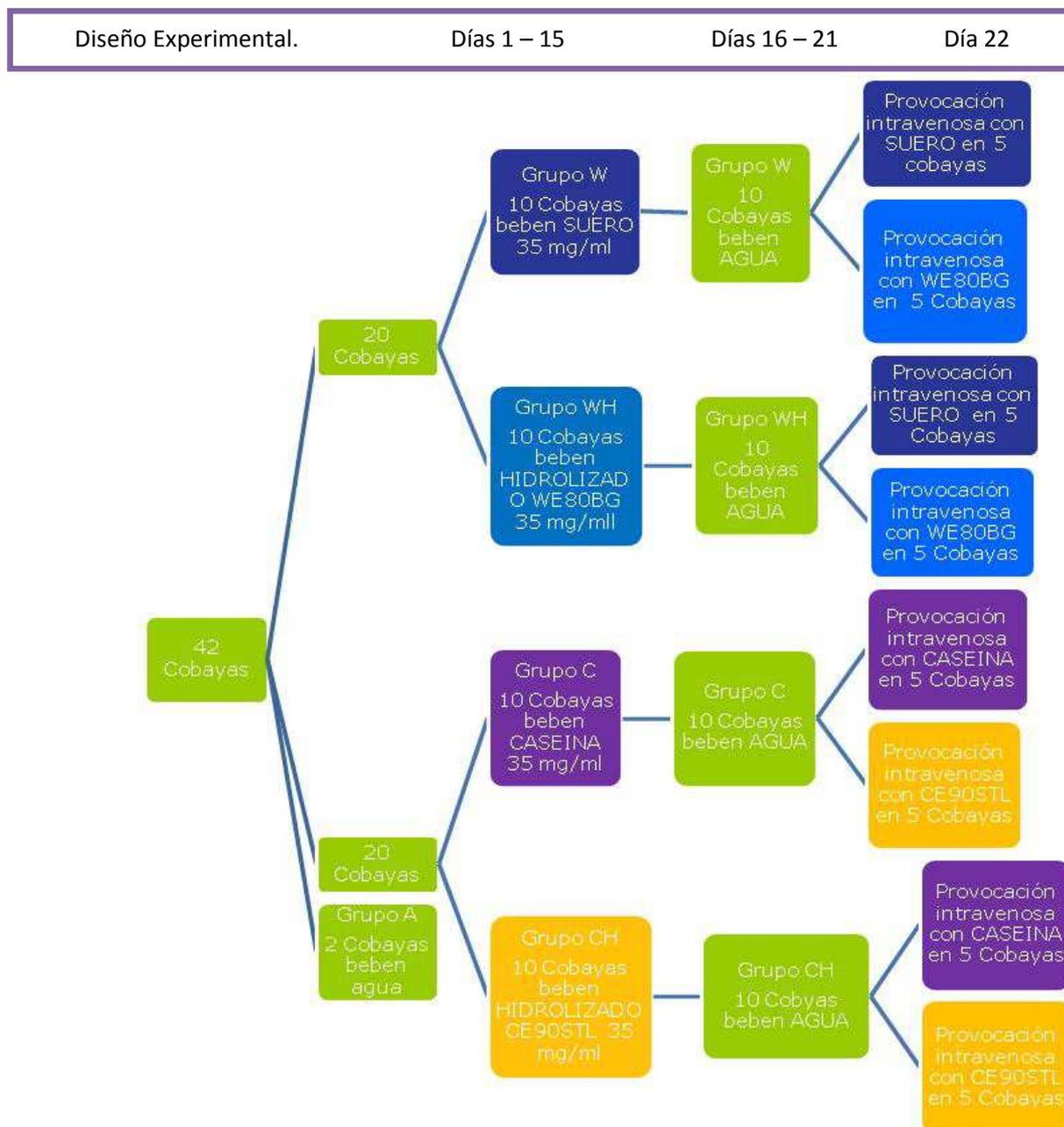


Figura 25. Diseño experimental de la prueba de anafilaxia.

Bajo anestesia con éter, se les fueron administrando por vía intravenosa 0.5 ml de una solución de las proteínas nativas o de los hidrolizados objeto de estudio, todas ellas en solución salina al 0.9% y en una concentración de 35 mg/ml, comprobando si existía anafilaxia fatal o no (Figura 25). Para la evaluación del grado de respuesta se utilizó la siguiente escala (Tabla 24):

Tabla 24. Escala de respuesta.

Síntomas	Grado de respuesta
Ausencia de reacción	0
Dificultad al respirar o enrojecimiento del pabellón auditivo o pelo erizado	1
Los 3 síntomas anteriores	2
Pérdida de control muscular	3
Convulsiones, coma	4
Muerte	5

Caracterización antigénica y nutricional de la nueva fórmula

Una vez realizada la caracterización de los hidrolizados, se procedió al diseño de la fórmula terapéutica. Se trata de un alimento para usos médicos especiales, destinado a lactantes con APLV. Las principales características de la fórmula son:

- Contenido en AGPI-CL (DHA y AA, en proporción 1:1): 0.5% de los ácidos grasos totales.
- Contiene nucleótidos.
- Contiene los hidrolizados proteicos extensos de caseína y suero en proporción 20:80.
- Contiene lactosa.

La proporción 20:80 de los hidrolizados se justifica en base a varias consideraciones:

- Aproximación al aminograma de la leche materna.
- Disminución del sabor amargo debido al menor contenido en péptidos derivados de la caseína.

La reconstitución del producto final será de 14 g de polvo en 90 ml de agua. La proporción caseína:suero (20:80) representa una novedad en el mercado de las fórmulas infantiles extensamente hidrolizadas para su uso en el tratamiento de las APLV. En la Tabla 25 se detalla la composición nutricional de la fórmula.

Tabla 25. Tabla Nutricional de la fórmula terapéutica.

FORMULA HIPOALERGENICA TERAPEUTICA - Macronutrientes					
			/100 g	/100 ml	/100 kcal
				14,0	
Valor energético					
Energía		Kcal	494	69	
		Kjul	2066	289	
Nutrientes					
Proteína		g	12,0	1,7	2,4
	Caseína	g	2,4	0,3	0,5
	Seroproteína	g	9,6	1,3	1,9
Grasa		g	25,7	3,6	5,2
	Aceite vegetal	g	25,3	3,5	5,1
	Fuente de AA	g	0,2	0,03	0,04
	Fuente de DHA	g	0,2	0,03	0,04
	Ac. linoleico	mg	4.190	586	848
	Ac. α -linolénico	mg	385	53	77
	Ac. araquidónico	mg	90	12,5	18,1
	Ac. docosahexaenoico	mg	90	12,5	18,1
Hidratos de carbono		g	53,6	7,5	10,9
	Lactosa	g	46,1	6,5	9,3
	Dextrinomaltosa	g	7,5	1,1	1,52

FORMULA HIPOALERGENICA TERAPEUTICA - Micronutrientes					
			/100 g	/100 ml	/100 kcal
Micronutrientes					
L-carnitina		mg	7,9	1,1	1,6
Taurina		mg	43,3	6,1	8,8
Inositol		mg	28,7	4,0	5,8
Colina		mg	52,2	7,3	10,6
AMP		mg	3,5	0,5	0,7
CMP		mg	11,9	1,7	2,4
UMP		mg	6,2	0,9	1,3
GMP		mg	2,0	0,3	0,4

FORMULA HIPOALERGENICA TERAPEUTICA – Minerales y vitaminas					
Minerales			/100 g	/100 ml	/100 kcal
Sodio		mg	150	21,0	30,3
Potasio		mg	500	70,0	101,3
Cloro		mg	315	44,1	63,8
Calcio		mg	400	56,0	81,0
Fósforo		mg	230	32,2	46,5
Relación Ca/P			1,7	1,7	
Magnesio		mg	50	7,0	10,1
Hierro		mg	5,5	0,8	1,1
Cinc		mg	4,0	0,6	0,8
Cobre		µg	305	42,8	61,8
Yodo		µg	80,3	11,2	16,3
Manganeso		µg	54,6	7,6	11,1
Selenio		µg	7,0	1,0	1,4
Vitaminas					
Vitamina A		µg	523	73,2	106
Vitamina D		µg	7,8	1,1	1,6
Vitamina E		mg	7,8	1,1	1,6
Vitamina K		µg	52,0	7,3	10,5
Vitamina C		mg	52,3	7,3	10,6
Vitamina B1		µg	526	74	107
Vitamina B2		µg	785	110	159
Niacina		mg	5,2	0,7	1,1
Vitamina B6		µg	525	73,6	106
Ác. Fólico		µg	78,0	10,9	15,8
Vitamina B12		µg	2,1	0,3	0,4
Biotina		µg	16,0	2,2	3,2
Ác. Pantoténico		µg	2347	329	475

Caracterización de la fórmula terapéutica

Una vez diseñada y formulada la nueva fórmula terapéutica se procedió a estudiar la capacidad antigénica y nutricional de la misma, mediante el desarrollo de ensayos en el laboratorio y un ensayo clínico con lactantes con diagnóstico de APLV. Los ensayos realizados son los siguientes:

- Distribución de pesos moleculares y peso molecular medio.
- Determinación del nitrógeno no proteico y osmolalidad de la fórmula.
- Identificación de péptidos bioactivos en la fórmula.
- Ensayo clínico con lactantes con APLV mediada y no mediada por IgE.

a) Distribución de pesos moleculares, peso molecular medio y aminoácidos libres

Para la distribución de pesos moleculares en la fórmula terapéutica el método seleccionado fue una modificación del método utilizado por *Rosendal y Barkholt, 2000*. La puesta a punto y validación del método pueden ser consultadas en la tesis de máster anteriormente mencionada. A modo de resumen, se pesaron 14 gramos de la fórmula terapéutica en polvo y se añadieron 60 ml de agua caliente a 40°C. Se agitó durante 10 minutos hasta su completa disolución. Para eliminar la fase lipídica se centrifugó a 8.000 X G durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación la capa lipídica se desechó y el sobrenadante proteico se filtró con filtros de 0.22 µm. La solución fue recogida en viales de 1.5 ml para su posterior análisis en el equipo de cromatografía, en el que se habían situado dos columnas en serie de exclusión por tamaño mencionadas anteriormente.

Para el cálculo del peso molecular medio se procedió de la misma manera que para el cálculo del peso molecular medio de los hidrolizados y el contenido en aminoácidos libres correspondería a la proporción de pesos moleculares inferiores a 200 Da encontrados en la distribución de pesos moleculares.

b) Contenido en nitrógeno no proteico y osmolalidad

El **nitrógeno no proteico**, fracción de nitrógeno soluble sobre nitrógeno total en ácido tricloroacético (TCA), es un parámetro útil en la caracterización de los hidrolizados. El TCA precipita todas las proteínas y una fracción importante de polipéptidos. Cuanto mayor sea el contenido de nitrógeno soluble en TCA, mayor será el grado de hidrólisis.

La **osmolalidad** constituye la medida del número total de moles de solutos en un kilogramo de agua y se determinó a partir de la disminución del punto de congelación del agua en presencia de solutos. De acuerdo a la *ley de Raoult*, la presión de vapor de la disolución será igual a la presión de vapor del disolvente, por la fracción molar del disolvente en la disolución. De acuerdo con esta fórmula, el descenso relativo de la presión

de vapor es proporcional a la molalidad, si la disolución es diluida. La presión de vapor depende de la temperatura, está relacionada con la tendencia que muestran las moléculas a abandonar el estado líquido y es un índice de la velocidad de evaporación.

El método utilizado para determinar la osmolalidad fue una variación del método descrito por *Pereira da Silva et al. 2008*. Se utilizó un osmómetro VAPRO model 5600. Vapor pressure osmometer. ELITechGroup Wescor® Biomedical system. Se disolvieron 9.4 gramos de la fórmula terapéutica en 60 ml de agua ultrapura MilliQ® caliente. El peso seleccionado correspondía al factor de reconstitución de la fórmula. Se agitó durante 5 minutos y una vez transcurrido ese tiempo se realizó su medida en el osmómetro. El osmómetro aspira 10 µl de la muestra. El sensor mide la disminución del punto de congelación. Los resultados se expresan como mmol/kg.

c) Identificación de Péptidos Bioactivos en la fórmula

De acuerdo con la revisión bibliográfica mencionada anteriormente, cabía la posibilidad de que esta nueva fórmula hipoalérgica contuviese pequeños péptidos bioactivos (pesos moleculares < 1500 Da) y que dichos péptidos tuviesen alguna función inmunomoduladora sobre la respuesta alérgica o que dispusiesen de alguna actividad antiviral, antibacteriana y/o antihipertensiva.

Por lo tanto, se procedió a realizar una digestión *in vitro* de la misma, simulando la digestión gastrointestinal del lactante y recogiendo el extracto soluble para la posterior identificación de péptidos bioactivos. A continuación se describen brevemente las dos etapas de este experimento:

Simulación de la digestión gastrointestinal in vitro.

Se disolvieron 14 gramos de la fórmula terapéutica en 90 ml de agua ultrapura MilliQ®. Para la simulación de la digestión gastrointestinal, se aplicó el método desarrollado por Hernández-Ledesma y col (2007). Se

tomaron 30 ml de la fórmula previamente reconstituida, y se trataron con pepsina y pancreatina.

La fórmula fue hidrolizada primeramente con pepsina (E.C 3.4.23.1; 1:10000, 1750 U/mg de proteína, Sigma, Chemical St Louis, MO, USA. Product Code No. P7000). El pH se ajustó a 3.5 y se mantuvo durante 30 minutos, con una proporción de enzima-sustrato de 58.8 mg/g de proteína y con agitación a 150 rpm. Este proceso de hidrólisis se inactivó, ajustando el pH a 7 con NaHCO_3 0.5 M, en un baño de agua con hielo. A continuación se añadió pancreatina de páncreas porcino, Sigma, Product Code No. P1750 y se incubó a 37°C con agitación durante 60 minutos. En este caso el enzima se inactivó posteriormente a 95°C durante 15 minutos.

El extracto soluble de la digestión, obtenido tras centrifugación durante 30 minutos a 20.000 X g y 5°C, se filtró a través de papel de filtro, Whatman no.41. A partir del sobrenadante se obtuvo la fracción inferior a 3000 Da, mediante ultrafiltración con una membrana de tamaño de corte de 3000 Da Centriprep® 3; Amicon, Inc., Beverly, USA

Análisis e identificación de los péptidos bioactivos.

Para la separación e identificación de péptidos, a partir del extracto soluble obtenido tras la digestión y ultrafiltración, se empleó un sistema de cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC), conectado a un detector de masas, cuadrupolo de trampa iónica, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany

El solvente A estaba constituido por una mezcla de agua y trifluoroacético (100:0.37, v/v) y el solvente B con una menor proporción de trifluoroacético (100:0.27, v/v). El gradiente de trabajo cambiaba de manera lineal, desde el solvente B al solvente A, de 0% a 45% en 80 minutos. El volumen de inyección fue de 50 μl , la columna cromatográfica, Hi-Pore RP-318, de dimensiones 250 \times 4,6 mm (Bio-Rad) y el flujo 0.8 ml/min.

El flujo en el interior del nebulizador del electrospray fue de aproximadamente 20 µl/min empleando nitrógeno como gas nebulizador y de secado. La presión de helio se mantuvo a 60 psi. El intervalo de adquisición (m/z) fue de 100-1500 m/z. Los iones fueron escaneados a una velocidad de 13000 Da/segundo. Los programas informáticos empleados en la identificación de los péptidos bioactivos fueron los siguientes:

Data Analysis (version 3.0; Bruker Daltoniks)

BioTools (version 2.1; Bruker Daltoniks)

Sequence Editor (version 2.1; Bruker Daltoniks)

Estos análisis se llevaron a cabo en el Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), Juan de la Cierva, 3. 28006 Madrid, España.

d) Ensayo clínico con lactantes con APLV

Se finalizó la validación de la seguridad, tolerancia y la capacidad nutricional de la nueva fórmula hipoalergénica con el desarrollo de un ensayo clínico con lactantes diagnosticados. Se diseñó un estudio prospectivo, multicéntrico y nacional con una única cohorte de pacientes, con APLV mediada y no mediada por IgE. El estudio seguía las recomendaciones de *ESPACI* y *ESPGHAN* 1999, *AAP* 2000 y actualizadas por la *SEICAP* y la *AEP* 2001, 2008. Los objetivos principales de este ensayo fueron los siguientes:

- Evaluar la seguridad/tolerancia de la fórmula mediante un ensayo de provocación con la fórmula terapéutica.
- Evaluar la seguridad/tolerancia de la fórmula en base a la presencia de episodios de reagudización de APLV, manifestados como clínica cutánea y respiratoria en lactantes con APLV mediada por IgE y de episodios de reagudización de APLV en lactantes con APLV no mediada por IgE, manifestados como clínica de síndrome malabsortivo, con esteatorrea y/o creatorrea patológicas.
- Evaluar su capacidad nutricional, según ganancia pondero-estatural.

Como objetivos secundarios del estudio:

- Evaluar la capacidad nutricional de la fórmula hipoalérgica, mediante indicadores analíticos (hemograma completo, ácido fólico, vitamina B12, ferritina, transferrina, VCM, calcio y albúmina).
- Evaluar la aceptabilidad de la fórmula hipoalérgica.

Cálculo del tamaño de la muestra

La población en estudio fueron lactantes entre 0 y 6 meses de edad, elegidos al azar entre los que acudían por primera vez a la consulta, sospechosos de sufrir APLV mediada por IgE y que ésta se confirmara como tal. El tamaño de la muestra debía permitir evaluar la tolerancia mediante la presencia de episodios de reagudización en lactantes con APLV.

$$n = Z_{\alpha}^2 p q / d^2$$

De acuerdo a esta fórmula con Z_{α} :1.96, p: proporción esperada 5% ($p=0.05$) ; $q:1-p = 0.95$; d: precisión (en este caso de un 10%), nos dió una $n=18$. Para estimar la tolerabilidad en este grupo de pacientes con una precisión de 7, un nivel de significación de 0,05 y asumiendo un 10% de pérdidas de seguimiento, se requería una muestra de 18 pacientes. Los criterios de inclusión y exclusión son descritos en la Tabla 26.

El término "retirada" hacía referencia al hecho de que un paciente no completase el estudio. Se documentaba el motivo de la retirada prematura del estudio y debía completarse la valoración final en el momento de la retirada del paciente, así como una explicación del motivo de la retirada del estudio y la fecha de abandono. Los motivos por los cuales un paciente podía finalizar su participación antes de lo previsto podían ser los siguientes (Tabla 27).

Tabla 26. Criterios de inclusión y exclusión.

Criterios de Inclusión	Criterios de Exclusión
Lactantes que no hayan tomado antes ningún hidrolizado o lo hayan tomado un máximo de 1 mes antes de iniciar el estudio.	Niños que hayan retornado a la lactancia materna exclusiva y mientras continúen con ella.
Los criterios clínicos habituales en estas patologías. En alergia de tipo inmediato, signos clínicos agudos fundamentalmente cutáneos (urticaria, eritema, angioedema) de aparición en relación con la ingesta de PLV (menos de dos horas de intervalo), presencia de anticuerpos IgE específicos para leche de vaca y/o sus proteínas (prick-test o anticuerpos séricos) y, cuando no esté contraindicada, prueba de provocación positiva, según los protocolos diagnósticos seguidos habitualmente. En alergia no inmediata, pacientes con cuadros clínicos y analíticos sugerentes de estas patologías	Lactantes que, en el momento de la inclusión, presenten signos de malnutrición o cuadro diarreico prolongado (de más de una semana).
Es requisito imprescindible el consentimiento informado por escrito previo de uno de los progenitores del paciente o de su representante legal	Lactantes con otras patologías concomitantes tales como síndromes de mala absorción (celiaquía), hepatopatías, enfermedades renales (acidosis tubular renal, insuficiencia renal crónica), hematológicas (hemoglobinopatías: anemia falciforme, talasemia), cardiopulmonares (cardiopatías congénitas, asma, fibrosis quística), enfermedad infecciosa crónica, SIDA, endocrinopatías (hipotiroidismo) y otras enfermedades que a juicio del investigador pudieran enmascarar los resultados del estudio.

Tabla 27. Motivos de retirada del estudio.

Criterios de retirada del estudio
Pérdida de seguimiento (Imposibilidad para contactar con padres/tutores)
Decisión de padres/tutores
Decisión del pediatra
Reacción adversa a la introducción del producto o con posterioridad, manifestada por un cuadro similar al del motivo de consulta. No es criterio de retirada la presencia aislada de pruebas cutáneas positivas al producto
Fallecimiento

La fórmula en estudio se administraba como sustitutiva de la fórmula basada en leche de vaca, que debería estar incluida en la dieta del lactante. En caso de aparición de intolerancia al producto se suprimiría completamente, se terminaba el estudio para ese paciente y se recurriría a cualquier otro hidrolizado extensivo de PLV existente en el mercado o, en

caso extremo, a una fórmula de aminoácidos (dieta elemental), siempre previa comprobación de su tolerancia. En todos los pacientes se instauró la alimentación complementaria según las normas pediátricas habituales en la actualidad, proporcionando indicaciones de retrasar la introducción de aquellos alimentos potencialmente alergénicos, como huevo y pescado, hasta después de los 18 meses de edad y siempre después de comprobar que no existiese hipersensibilidad, es decir, anticuerpos IgE específicos en piel o suero, para dichos alimentos. Se proporcionaron indicaciones respecto a evitar el contacto con otros alérgenos (mascotas, etc.) y ambientes con humo de tabaco y se administraron las vacunas profilácticas y complementos vitamínicos indicados en niños normales.

Durante el periodo de seguimiento los lactantes reclutados debían acudir a un contacto inicial (visita1/basal), al mes ± 1 semana desde la visita basal (visita 2), a los 2 meses ± 1 semana desde la visita basal (visita 3) y a los 3 meses ± 1 semana de la visita basal (visita 4/final).

Variables del estudio

1. Las variables principales del estudio fueron las siguientes:
 - Episodios de reagudización relacionados y no relacionados con transgresiones de la dieta indicada. Anotación de los episodios de APLV definidos por la presencia de alguna de las siguientes entidades clínicas relacionadas, a juicio del investigador, con alguna de las formas de APLV y especificar las mismas (Tabla 28). El investigador recogía la información de esta variable a partir de la anamnesis a los padres, de la historia clínica o del diario del lactante.

Tabla 28. Síntomas clínicos de la APLV

Síntomas clínicos
Erupción cutánea
Prurito
Angioedema labial, palpebral
Rinorrea acuosa
Hiperemia conjuntival
Diarrea
Esteatorrea
Rectocolitis hemorrágica
Dolor abdominal
Cólico
Estreñimiento
Anafilaxis
Pérdida de peso
Peso estacionado
Vómito

- Ganancia pondero-estatural: Anotación de peso (gramos), longitud (cm) y perímetro cefálico (cm), con posterior transformación a percentil, según curva de crecimiento de la OMS.
2. Las variables secundarias del estudio (variables socio-demográficas y clínicas) fueron las siguientes:
- Variables sociodemográficas:
 - Edad a la inclusión: meses más días del lactante a la inclusión en el estudio.
 - Género del lactante.
 - Convivencia: número de hermanos en edad escolar y número de adultos que convivían con el lactante en su domicilio habitual.
 - Nivel de estudios de los padres
 - Tabaquismo pasivo: presencia de fumadores en el domicilio habitual del lactante.
 - Antecedentes familiares: antecedentes en familiares de primer grado de dermatitis atópica, urticaria de repetición, rinitis alérgica, asma y gastroenteropatías

- Variables clínicas:
- Datos perinatales: edad gestacional (semanas), peso al nacer (kg).
- Tiempo de lactancia materna: lactancia materna exclusiva si/no y número de días que el lactante había recibido lactancia materna, si fuera el caso.
- Tiempo de lactancia mixta.
- Fórmula de lactancia artificial: fórmula que estuviese recibiendo el lactante previamente a su inclusión al estudio.
- Alimentación complementaria: se anotaba en la visita basal la alimentación complementaria recibida previamente y en el diario del lactante, los alimentos complementarios que recibían a diario.
- Fecha de diagnóstico de APLV y edad de inicio de la APLV
- Síntomas y signos recogidos en la historia clínica del paciente: erupción cutánea, prurito, angiodema labial, palpebral, broncoespasmo, sibilancias, rinorrea acuosa, hiperemia conjuntival, diarrea, esteatorrea, vómito, rectocolitis hemorrágica, dolor abdominal, cólico, estreñimiento, anafilaxis, pérdida de peso, peso estacionado, etc...
- Resultados de los métodos de diagnóstico aplicados (analítica de sangre, pruebas cutáneas, prueba de provocación, etc.).
- Cantidad diaria de fórmula hipoalérgica: se anotaba la cantidad diaria consumida de fórmula en el diario del lactante.
- Aceptabilidad de la fórmula hipoalérgica

Los lactantes con APLV reclutados eran evaluados por el investigador, asegurando la confidencialidad y el rigor de la investigación. A continuación se detalla toda la información relativa al paciente que se recogería en el

cuaderno de recogida de datos, CRD, del estudio en cada una de las visitas realizadas (Tabla 29).

Tabla 29. Variables en las distintas visitas.

Variables del estudio	Visita 1 Basal	Visitas 2 y 3	Visita 4 Final
Edad a la inclusión y género	X		
Convivencia	X		
Nivel de estudios de los padres	X		
Tabaquismo pasivo	X		
Antecedentes familiares de alergia	X		
Características clínicas ed proceso	X		
Fecha y método de diagnóstico	X		
Número y fecha de episodios de reagudización		X	X
Ganancia póndero-estatural		X	X
Cantidad diaria de la fórmula Hero en estudio		X	X
Lactancia materna	X		
Fórmula/Alimentación complementaria	X	X	X
Determinación analítica	X		X
Aspecto de las heces	X	X	X
Aceptabilidad		X	X
Acontecimientos adversos		X	X
Satisfacción		X	X

La evaluación beneficio-riesgo para los sujetos de investigación, sostenía que el lactante que participase en el estudio, recibiría una fórmula hipoalérgica, desarrollada con los controles previos de seguridad, con resultados satisfactorios, realizados en estudios *in vitro* e *in vivo* de antigenicidad, y con una composición de la fórmula regulada por la normativa de fórmulas de inicio y continuación. Su participación en el estudio ayudaría a extraer conclusiones que serían de interés en el futuro para el manejo la APLV.

En cuanto a la confidencialidad de los datos, antes de la inclusión de un paciente en el estudio, se les informaba a los padres, acerca de los objetivos del estudio, la metodología a seguir durante el estudio, y la

confidencialidad de los datos. Los padres fueron informados sobre su derecho a poder retirarse del estudio en cualquier momento, sin que por ello resultase perjudicada la relación médico-paciente. Se les proporcionó una hoja de información y un ejemplar del consentimiento informado. El consentimiento informado debía ser aceptado y firmado por uno de los progenitores del lactante o su representante legal. La información referente a la identidad de los pacientes se consideraba confidencial a todos los efectos. La identidad de los pacientes no sería desvelada ni divulgada. Los datos de los pacientes recogidos en el CRD debían documentarse de manera anónima, vinculándose a un código y número de paciente, de manera que únicamente el investigador podía asociar tales datos a una persona identificable. El desarrollo del ensayo, cumplía lo establecido en la *Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de 'Protección de Datos de Carácter Personal'*. La base de datos que generó el estudio no contenía identificación alguna del paciente, excepto un código numérico por el que no era posible desvelar su identidad. Dicha identidad quedaba siempre entre la relación médico-paciente y no podía conseguirse sin el consentimiento de ambos. Se recogieron las hojas originales del CRD una vez completado el mismo, quedándose el investigador las copias que debía guardar y archivar confidencialmente. El investigador principal de cada centro fue el responsable de mantener un archivo del estudio que contendría, al menos, los datos de identificación del paciente.

Se consideraron acontecimiento adverso grave a toda experiencia adversa en relación al consumo o no de la fórmula hipoalergénica, que producía alguno de los siguientes resultados:

- Muerte.
- Acontecimiento adverso potencialmente mortal.
- Incapacidad o invalidez permanente o significativa.
- Hospitalización o prolongación de una hospitalización previa.

También se consideraron acontecimientos adversos graves aquellos que según un criterio médico adecuado, podían poner en peligro al paciente o requerían intervención médica o quirúrgica para prevenir una de las situaciones mencionadas. Ejemplos de tales acontecimientos fueron: el

broncoespasmo alérgico que requiriese tratamiento intensivo en una unidad de urgencias o en el domicilio, las discrasias sanguíneas o convulsiones que no precisasen la hospitalización del paciente, o el desarrollo de una dependencia farmacológica o abuso de fármacos. El investigador debía evaluar la relación de todo acontecimiento adverso con el uso de la fórmula hipoalérgica, basándose en la información disponible y en las siguientes directrices (Tabla 30):

Tabla 30. Evaluación de la relación consumo fórmula en estudio con la aparición de un acontecimiento adverso.

Directrices
Relación improbable: no hay asociación temporal o se ha identificado la causa del acontecimiento, o ésta no puede atribuirse al producto del estudio
Posiblemente relacionado: existe asociación temporal, pero la causa es probablemente de otra etiología; no obstante, no puede descartarse la implicación del producto del estudio
Probablemente relacionado: existe asociación temporal y son posibles otras causas, aunque improbables

El investigador debía notificar al promotor todos los acontecimientos adversos graves, se consideren o no relacionados con el producto en estudio o esperados, utilizando una hoja de notificación de acontecimientos adversos graves, con la máxima brevedad posible. La valoración de la gravedad de los acontecimientos adversos se basó en las siguientes definiciones (Tabla 31).

Tabla 31. Gravedad de los acontecimientos adversos.

Valoración de la gravedad -Síntomas clínicos
Leve: Se tiene conocimiento del signo, síntoma o acontecimiento, pero éste se tolera fácilmente
Moderado: Existe malestar suficiente como para interferir en la actividad habitual.
Grave: Produce incapacidad para realizar las actividades habituales o afecta significativamente al estado clínico y justifica una intervención. También incluye acontecimientos potencialmente mortales (riesgo inmediato de muerte), fallecimientos, hospitalizaciones o prolongación de una hospitalización previa.

Métodos de diagnóstico de la APLV

Los métodos de diagnóstico de APLV mediada por IgE empleados, fueron los siguientes:

- Determinación de IgE específica.

- Determinación de IgE total.
- Pruebas de provocación oral.

La determinación de IgE específica se realizó por prueba cutánea y, siempre que fuese posible, por cuantificación de anticuerpos IgE específicos en suero.

La prueba cutánea, método de punción (prick test), se realizaba sobre la cara volar del antebrazo, con lectura a los 15 minutos. Se valoró según los criterios habituales, *EAACI Position Paper. Allergen standardization and Skin test*: semisuma del diámetro máximo de la pápula y de su ortogonal. Se consideró positiva una pápula igual o mayor de 3 mm de diámetro. Se utilizaron como controles de positividad, clorhidrato de histamina (10 mg/ml) y de negatividad, solución salina tamponada a pH 7,2 y 50% de glicerina. Los antígenos para la prueba cutánea fueron:

- Comerciales para leche de vaca completa, clara de huevo y pescado (bacalao).
- Antígenos de proteínas de leche de vaca (β -lactoglobulina, α -lactalbúmina, caseína y seroalbúmina bovinas) a una concentración final de 10 mg proteína/ml en solución salina glicerinada.
- Extracto del hidrolizado estudiado, a una concentración de N proteico equivalente a 10 mg proteína/ml en solución salina glicerinada.

Se realizó la determinación de IgE específica en suero, para los antígenos indicados. El método utilizado fue el sistema CAP, Phadia Immunocap o similar. Se consideraron positivos valores superiores a 0,35 kUA/L. Si se utilizaba un procedimiento distinto al CAP, deberían transformarse los resultados, con el fin de que fuesen comparables entre los distintos pacientes. La determinación de IgE total fue prescindible. Se utilizó un sistema con límites de determinación entre 1 y 2000 kU/L de IgE.

Las pruebas de exposición, tolerancia o provocación se realizaron en una unidad de provocación dotada de medios de tratamiento e intervención

apropiados. El lactante debía presentar buen estado general, sin ningún proceso intercurrente. Se efectuaron por procedimiento abierto. La prueba de provocación diagnóstica o de tolerancia en la evolución con leche de vaca, se realizó por un procedimiento lento, con el fin de evitar al máximo las reacciones intensas:

1º día: fórmula de leche para lactantes en dosis creciente, 2, 5 y 10 ml con intervalos de 90 minutos.

2º día, 25 ml.

3º día, 50 ml.

4º día, 100 ml.

En cada ocasión, el paciente permanecía en observación un mínimo de 4 horas a partir de la última toma de cada día. Si en cualquiera de estas tomas se producía reacción se interrumpía la provocación y se administraba el tratamiento adecuado, si era necesario. Se consideró positiva la prueba de provocación cuando aparecían signos cutáneos (urticaria, angioedema, eritema, rash), gastrointestinales (vómitos o diarrea), respiratorios (rinoconjuntivitis, broncoespasmo) o generalizados (anafilaxia) durante las dos horas siguientes a la toma del alimento. Si se lograba buena tolerancia con 100 ml, el paciente continuaba con alimentación libre en casa en la forma habitual, confirmando la tolerancia a los 15 días mediante llamada telefónica. La prueba diagnóstica de provocación o exposición a leche de vaca no se realizó, por considerarse contraindicada, en las siguientes circunstancias (Tabla 32).

Tabla 32. Casos en los que no se realiza la prueba de provocación oral.

CONTRAINDICACIONES DE LA PRUEBA DE ANAFILAXIA	
•	Cuadros de anafilaxia generalizada o edema de glotis, en relación con PLV
•	Episodios de urticaria y/o angioedema generales, aparecidos antes de transcurrir 60 minutos de la ingestión de PLV, repetidos dos o más veces, sin que hayan pasado más de tres meses desde el último episodio. Deben acompañarse de pruebas cutáneas positivas (> 3 mm) y de IgE específica para PLV superior a 0,35 kU/L.
•	Otras situaciones que se acompañen de IgE específica para leche de vaca o sus proteínas superior a 3 kU/L, ya que la probabilidad de que la provocación sea positiva es del 90%

En la valoración del crecimiento y desarrollo de todos los lactantes con APLV incluidos en el estudio, se realizaron las medidas antropométricas habituales de seguimiento de lactantes. Se utilizaron las Tablas de crecimiento de la OMS:

- Peso (gramos) (percentil, porcentaje peso estándar, peso-edad)
- Longitud (centímetros) (percentil, porcentaje talla estándar, talla-edad)
- Perímetro cefálico (centímetros)
- Composición corporal (peso-talla, índice de masa corporal)

Mediante los formularios de alimentación (Tabla 33) y el formulario de recogida de episodios adversos (Tabla 34) encontrados en el CRD del lactante, se completaron los datos de valoración de tolerancia y aceptación de la fórmula.

Tabla 33. Ejemplo formulario de alimentación en CRD del lactante.

DIA 1 FECHA:--/--/-- Día/mes/año			
Hora	Cantidad de fórmula en ml	Alimentación complementaria	Solo toma fórmula

Tabla 34. Ejemplo formulario de episodios adversos en CRD del lactante.

FECHA PRIMER EPISODIO: ___ / ___ / _____ (día/mes/año)			
Episodio de alergia a las proteínas de la leche de vaca	Sitio o centro de atención	Tratamiento	Transgresión del tratamiento*
<input type="checkbox"/> Dermatitis atópica/ erupción cutánea <input type="checkbox"/> Urticaria aguda/ habones en el cuerpo <input type="checkbox"/> Angioedema/ hinchazón párpados, labios <input type="checkbox"/> Estreñimiento <input type="checkbox"/> Diarrea <input type="checkbox"/> Esteatorrea <input type="checkbox"/> Vómitos <input type="checkbox"/> Dolor abdominal/ cólico / retortijones <input type="checkbox"/> Broncoespasmo/ sibilancias/ pitos/ dificultad para respirar <input type="checkbox"/> Rinoconjuntivitis/ mucosidad acuosa/ ojos enrojecidos <input type="checkbox"/> Pérdida de peso/ Sin cambios en el peso <input type="checkbox"/> Otros:_____	<input type="checkbox"/> Casa <input type="checkbox"/> Consulta pediatría hospital <input type="checkbox"/> Consulta pediatría atención primaria <input type="checkbox"/> Urgencias atención primaria <input type="checkbox"/> Urgencias hospital <input type="checkbox"/> Otros:_____	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No	<input type="checkbox"/> Sí <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Sospecha (no confirmado)

Experimento 2. Estatus Nutricional de los AGPI-CL ω -3 y ω -6

De acuerdo a lo expuesto en la revisión bibliográfica, y a nuestro interés en ampliar la evidencia científica sobre el papel que podían estar ejerciendo los AGPI-CL, DHA y AA, en el tratamiento o prevención de las alergias, se pretendió en este trabajo determinar el contenido en la membrana de los eritrocitos en DHA y AA, antes y después de tratar durante tres meses consecutivos a una cohorte de lactantes con APLV, con una fórmula hidrolizada enriquecida con AA y DHA en una proporción 1:1 y una concentración de 0.5 gramos de estos ácidos en 100 gramos de grasa total.

Toma de muestras en los centros hospitalarios

Para realizar estos análisis de AGPI-CL en la membrana de los eritrocitos se diseñó un protocolo de toma de muestras de plasma y eritrocitos, a aplicar por los responsables en los centros hospitalarios.

Para obtener los eritrocitos se centrifugaba la sangre (aproximadamente 1 ml) a 1700 x g durante 10 minutos y se retiraba el sobrenadante (plasma) en un tubo eppendorf Safe-Lock Tubes (1.5ml) y la capa blanca de células (glóbulos blancos). El anticoagulante utilizado para las muestras fué EDTA-tripotásico. Al precipitado de eritrocitos (si se obtenía 1 ml de sangre en realidad se obtendrían alrededor de 0.5 ml de pellet) se debía añadir inmediatamente después de la centrifugación y tras la separación del suero, 3 μ l de la disolución de tocoferol (la adición de vitamina E debía ser alrededor de 1000 ppm en el pellet de eritrocitos). Después de la adición tenían que agitar suavemente para homogeneizar la muestra y congelar a -80°C (o en su defecto a -30°C), hasta su envío al laboratorio de análisis donde se extraían las membranas de eritrocitos. Los eritrocitos se podían congelar en un tubo eppendorf o en el mismo tubo de centrífuga, y el plasma separado en otro tubo eppendorf, para el análisis de citocinas.

La disolución de acetato de α -Tocoferol se preparó disolviendo acetato de α -tocoferol en metanol al 40%, es decir, 400 μ l de tocoferol acetato hasta 1 ml con metanol. La disolución se mantuvo en refrigeración entre $2-6^{\circ}\text{C}$ y se renovaba

cada 2 meses. Esta disolución se preparó en el Instituto de Nutrición Infantil Hero y se distribuía a los centros hospitalarios seleccionados.

Finalmente, las muestras de eritrocitos y citocinas eran almacenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (en su defecto a $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$) hasta su posterior envío al laboratorio de análisis.

Análisis de los AGPI-CL en la membrana de los eritrocitos

Obtención de membranas de eritrocitos

Para obtener las membranas de eritrocitos se centrifugó la sangre a $1700 \times g$ durante 10 min y se retiró el sobrenadante (plasma) y la capa blanca de células (glóbulos blancos). El botón de glóbulos rojos se lavó con igual volumen de tampón isotónico Tris 0.173 M pH 7.6 , mezclándolo con cuidado por inversión para no romper las membranas y se centrifugó a $1700 \times g$, durante 10 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se eliminó el sobrenadante y se repitió el lavado dos veces más, de igual manera y con el mismo tampón isotónico. La hemólisis de los glóbulos rojos se llevó a cabo añadiendo 1 o 2 ml de tampón hipotónico Tris, agitándolo y centrifugándolo a $20000 \times g$, durante 20 min, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El precipitado que se obtuvo se lavó sucesivas veces con 30 ml de tampón y se centrifugó a $20000 \times g$, 20 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que las membranas quedaron totalmente limpias.

Extracción lipídica de membrana de los eritrocitos

En tubos pirex se adicionó al residuo de membranas correspondientes a 3 ml de sangre, 4 ml de hexano-isopropanol 3:2 con 25 mg/l de BHT (opcional añadir 1 ml de HCl $0,01\text{ N}$ para precipitar las proteínas y 0,1 ml de MgCl_2 al 0,25% como antiemulsionante). Se agitó en un vortex, Test tube shaker. Yellow line by IKA®, la mezcla durante un minuto y se centrifugó a $1500 \times g$ (3000 rpm) durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se obtuvieron dos fases: una inferior acuosa y otra superior con los lípidos y el hexano. Se separó la fase superior (sin agotarla). La fase acuosa se extrajo 3 veces con 4 ml de hexano, agitando la mezcla durante un minuto y centrifugándola a $1500 \times g$ (3000 rpm) durante 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, recogiendo la fase orgánica sobre los tubos pirex, pudiendo conservarla a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta posterior manipulación (24h).

Determinación de AGPI-CL en la membrana de los eritrocitos

La cuantificación de los ésteres metílicos de los ácidos grasos se realizó por cromatografía gas-líquido. Cuando se procesaban las muestras, se evaporaba el hexano con N₂ y se resuspendían en 75-200 µl de hexano: metiliterbutiléter: ácido acético (100:3:0,3), inyectándose 1 µl en la columna del cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890A (USA), equipado con una columna capilar SUPELCO PHASE SPTN2330 F.S. de 60 metros de longitud y 0.32 mm de diámetro interno, impregnada con 0.20 µm de espesor de la fase estacionaria biscianopropilfenil polisiloxano. El sistema de inyección, debía estar en la modalidad "splitter" y con una relación de partición de 1:60. Las condiciones de flujos de gases para el análisis cromatográfico fueron las siguientes:

Los flujos de los gases del detector son:

Hidrógeno 30 ml/min

Aire 400 ml/min

Nitrógeno 4 ml/min

Flujo del gas portador (Nitrógeno):

Flujo de entrada 60 ml/min

Flujo en columna 1 ml/min

La separación cromatográfica se llevó a cabo en gradiente de temperatura, durante 40 minutos:

Temperatura del inyector 200 °C

Temperatura del detector 250 °C

Programa de temperatura en el horno cromatográfico:

5 min a 160°C

15 min hasta 190°C (2°C/min)

10 min hasta 220°C (3°C/min)

12 min a 230°C (15°C/min)

El cálculo del factor de respuesta para cada uno de los ácidos grasos se realizó a partir de las soluciones patrón de cada uno de los ácidos grasos.

Experimento 3. Biomarcadores de tolerancia antigénica

En este experimento se pretendía estudiar el papel de los AGPI-CL, DHA y AA en el tratamiento de la APLV, mediante el análisis de citocinas proinflamatorias, proalérgicas y reguladoras en muestras de plasma. Para ello, y puesto que el perfil de citocinas en plasma es un indicador del estado o evolución del sistema inmunitario del lactante alérgico, se determinaron los niveles de citocinas (IL-13, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A, IFN- γ y TGF- β) en plasma, tras el diagnóstico de la alergia y transcurridos tres meses de tratamiento nutricional. Se estudió si existía algún efecto beneficioso atribuido al tratamiento nutricional con DHA y AA en los lactantes con APLV, estudiando si existía correlación entre el perfil de citocinas en plasma y el contenido de AA y DHA en la membrana de los eritrocitos.

Determinación de citocinas en plasma

Para la determinación de citocinas en plasma se estableció un protocolo de toma de muestra proporcionado a los hospitales participantes en este ensayo clínico. Este protocolo de toma de muestras de citocinas se ha descrito en el experimento 2. Los tubos eppendorf con las muestras de plasma fueron congelados a -80°C hasta su posterior envío a los laboratorios de análisis.

Posteriormente, y una vez recepcionadas las muestras en el laboratorio de análisis, se determinaron los niveles de citocinas y factores de crecimiento IL-13, IL-4, IL-8, IL-10, IL-17A y TGF- β en plasma, mediante detección simultánea de multianálisis utilizando Kits de ensayo MILLIplex y la Tecnología xMAP de Luminex, el sistema completo incluyó el Luminex 200, la plataforma XY para placas, y el sistema de suministro de fluido Luminex SD, software IS y PC. Luminex® Corporation. Dicha tecnología se realizó a través de un proceso que coloreaba microesferas de polietileno de $5.2\ \mu\text{m}$ con dos fluorocromos; la utilización de diferentes proporciones de estos fluorocromos permitió colorear de manera diferente hasta 100 tipos diferentes de microesferas a las cuales se unía un anticuerpo de captura específico para un biomarcador y que podían ser identificadas con un láser. Esta metodología permitió el análisis cuantitativo de

varios biomarcadores utilizando una cantidad de muestra muy reducida (25-50 μ l de plasma o suero). Se utilizaron anticuerpos de la firma LINCOplex™ correspondientes al panel de citocinas.

El kit utiliza una curva estándar con concentraciones que varían entre 3.2 y 10,000 pg/ml, si bien cada uno de los analitos tenían una concentración mínima detectable característica de cada uno de ellos, concentraciones que se indican a continuación (Tabla 35). Los valores de concentración menores a 3.2, es decir, por debajo del valor de concentración del estándar 1, se obtenían por extrapolación del propio aparato y si hubiera alguno inferior al límite detectable para cada analito, que también puede suceder, sería un valor "dudoso", aunque se obtuviese por extrapolación.

En el caso del TGF- β , la curva tenía unas concentraciones que oscilaban entre 9.8 y 10,000 pg/ml, siendo la concentración mínima detectable de 10 pg/ml.

Tabla 35. Concentración mínima de citocinas detectable.

Citocinas	Concentración mínima detectable pg/ml
IL-4	4.5
IL-13	1.3
IL-17A	0.7
IL-8	0.4
IFN- γ	0.8
IL-10	1.1
TGF- β	10

Estos análisis se llevaron a cabo por el grupo CTS-461 del INYTA, en el Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, Campus de la Salud, 18071 Granada, España.

Análisis estadístico de los resultados

Análisis estadístico de la calidad proteica

La evaluación de la calidad proteica de los hidrolizados, CE90STL y WE80BG, se evaluó mediante ANOVA de una vía. Valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos. Las comparaciones de medias entre grupos específicos, se realizaron mediante un test de Bonferroni, cuando las varianzas eran iguales o mediante el test de Tamhane, cuando fueron desiguales. Para la determinación de la igualdad de varianzas se realizó un test de Levene. Todos los cálculos estadísticos se llevaron a cabo usando el programa estadístico SPSS 18.0 para Windows.

Análisis estadístico del contenido de proteína inmunoreactiva

Los resultados obtenidos en la cuantificación de la proteína inmunoreactiva, se expresaron como la media \pm desviación estándar.

Análisis estadístico del ensayo clínico

Características sociodemográficas y clínicas de la población

Se realizó un análisis descriptivo de las características sociodemográficas y clínicas de la población de estudio. Para describir variables continuas se utilizó la media, desviación estándar, mínimo, mediana, máximo y recuento de casos válidos y en el caso de variables categóricas el número y porcentaje para cada categoría de respuesta.

Variable principal

Para la evaluación de la tolerabilidad se describió el porcentaje de pacientes con episodios de reagudización de APLV en cada visita de estudio y el porcentaje de pacientes con aparición de nuevos episodios en alguna de las visitas de seguimiento respecto la visita basal. Para cada uno de los porcentajes se calculó también el intervalo de confianza del 95%. También se describió el número y características de los episodios de reagudización de APLV, en cualquiera de sus formas, presentados durante el período de seguimiento en cada una de las cohortes de pacientes.

Para evaluar la capacidad nutricional se describió la ganancia póndero-estatural del lactante durante el período de seguimiento, mediante la medición del peso, talla y perímetro cefálico. Estas medidas se expresaron como puntuación estándar o Z, que indica el número de desviaciones estándar que se encuentran por encima o por debajo de la media del valor de referencia utilizado para una medida determinada en relación con las medidas de referencia de las Tablas de crecimiento de la OMS

Variables secundarios

Se describía el nivel de aceptación de la fórmula hipoalergénica por parte de los lactantes. La cantidad de fórmula hipoalergénica y la alimentación complementaria diaria ingerida por los lactantes. Para éste propósito se describía la cantidad diaria media de fórmula hipoalergénica consumida y el número y porcentaje de lactantes con alimentación complementaria.

Aspectos analíticos generales

Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS 18.0 para Windows. En todas las pruebas estadísticas realizadas con las variables de resultados se utilizará un nivel de significación estadística de 0,05. Se utilizaron técnicas estadísticas preliminares a la realización de las pruebas descritas en los apartados anteriores para asegurar el cumplimiento de los supuestos estadísticos. En el caso de que no se cumpliesen los supuestos establecidos se utilizaron pruebas equivalentes que no presentasen dichas limitaciones, como son las pruebas no paramétricas.

RESULTADOS

Experimento 1. Caracterización antigénica y nutricional de la fórmula.

A continuación se detallan los resultados obtenidos durante la validación de la fórmula hipoalérgica, desde el punto de vista antigénico y nutricional.

Caracterización antigénica y nutricional de los hidrolizados

Caracterización de los hidrolizados

La Tabla 36 representa la distribución de pesos moleculares de ambos hidrolizados, así como el peso molecular medio. Se observa como todos los péptidos contenidos presentaron pesos moleculares inferiores a 3000 Da.

Tabla 36. Distribución de Pesos Moleculares en los hidrolizados.

% Distribución	CE90STL Hidrolizado de Caseína	WE80BG Hidrolizado de Suero
> 3000 Da	0.00	0.00
3000-2500 Da	5.10	0.00
2500 - 1000 Da	15.24	49.00
< 1000 Da	79.66	51.00
Peso molecular medio	607	870

El contenido de las proteínas lácteas, β -lactoglobulina y caseína, se describe en la Tabla 37. Dichos contenidos se encontraron cerca del límite de detección de los métodos ELISA empleados.

Tabla 37. Contenido en proteínas inmunoreactivas.

% Distribución	CE90STL Hidrolizado de Caseína	WE80BG Hidrolizado de suero
β - lactoglobulina mg/kg	0.73	1.97
Caseína mg/kg	1.22	5.5

Caracterización in vivo- Valor biológico de los hidrolizados

La Tabla 38 muestra los resultados obtenidos para los distintos índices de calidad nutricional en cada una de las fuentes proteicas estudiadas. Los principales resultados fueron los siguientes:

Tanto el grupo alimentado con la dieta que contenía el hidrolizado de suero (WE80BG) como el grupo alimentado con dieta que contenía el hidrolizado de caseína (CE90STL) presentaron un valor del índice de utilización neta de la proteína (NPU) inferior al grupo de referencia.

La ingesta de proteína fue ligeramente superior ($P= 0.106$) en los grupos que tomaron los hidrolizados y el incremento de peso tendió a ser menor ($P= 0.087$), pudiéndose deber al menor valor biológico de la proteína de los hidrolizados.

Tabla 38. Índices de calidad proteica.

Índice	CE90STL	WE80BG	CASAIN93	p
CDV	92.44±0.52 ^b	92.04±0.19 ^b	94.62±0.32 ^a	< 0.001
VB	75.27±2.04 ^b	72.99±1.85 ^b	85.64±1.46 ^a	< 0.001
NPU	69.55±1.79 ^b	67.78±1.71 ^b	81.01±1.24 ^a	< 0.001
PER	3.69±0.09 ^b	3.62±0.07 ^b	4.14±0.11 ^a	0.001
PER %	89	87	100	
Ingesta g/proteína/día	1.45±0.08	1.45±0.08	1.32±0.14	0.106
Incremento Peso g/rata/día	4.83±0.52	4.85±0.56	5.47±0.85	0.087

CDV: Coeficiente de digestibilidad verdadera. NPU: Utilización neta proteica. VB: Valor biológico.

PER: Coeficiente de eficacia en crecimiento. Los valores que no comparten una letra superíndice son significativamente diferentes $p < 0,05$.

El valor biológico de la proteína (VB) para ambos casos fue superior al 70% y el coeficiente de eficacia en crecimiento (PER) fue superior a 2.5. En consecuencia cumplían con los requerimientos establecidos para ser considerados como fuente adecuada de nitrógeno amino para la nutrición humana (*Acta Paediatrica, 1977*).

El coeficiente de digestibilidad verdadera (CDV) y la utilización neta de la proteína (NPU) en los hidrolizados disminuyó respecto al grupo de la caseína, por eso se puede decir que la hidrólisis ejercía un efecto negativo sobre ambos, probablemente debido a la competencia por los transportadores intestinales entre los aminoácidos libres; también podría deberse a la alteración de los aminoácidos por efecto del tratamiento, pero es relativamente poco probable debido al bajo contenido en hidratos de carbono de los hidrolizados.

Caracterización in vivo- Prueba de anafilaxia sistémica con los hidrolizados

Los resultados obtenidos en la evaluación de anafilaxia sistémica se muestran en la Tabla 39. Los principales resultados fueron los siguientes:

En el grupo de cobayas sensibilizado vía oral con proteína de suero, al ser practicada la prueba de anafilaxia sistémica con la proteína intacta (suero), todos los animales experimentaron la muerte.

En el grupo de cobayas sensibilizado oralmente con caseína, al practicarles la prueba de anafilaxia con la proteína (caseína), un animal resultó muerto y el resto se caracterizaron por el enrojecimiento de las orejas y el erizamiento del pelo.

Los grupos de animales a los que se les administró la solución con los hidrolizados no experimentaron síntomas durante la administración ni en la prueba de anafilaxia al igual que el grupo control negativo, al que se les administró agua.

Tabla 39. Resultados de la evaluación de anafilaxia sistémica en cobayas sensibilizadas por vía oral (Criterio de puntuación).

Grupo	WH		W		CH		C		Agua	
	W	WH	W	WH	C	CH	C	CH	C	W
Animal 1	0		5		0		2		0	
Animal 2	0		5		0		2			0
Animal 3	0		5		0		3			
Animal 4	0		5		0		2			
Animal 5	0		5		0		5			
Animal 6		0		0		0		0		
Animal 7		0		0		0		0		
Animal 8		0		0		0		0		
Animal 9		0		0		0		0		
Animal 10		0		0		0		0		

Grupos: WH (hidrolizado de suero); W (suero); CH (hidrolizado de caseína); C (caseína); CH (caseína hidrolizada); 0 (ausencia de reacción); 1 (Dificultad para respirar o enrojecimiento del pabellón auditivo o pelo erizado); 2 (los 3 síntomas anteriores); 3 (pérdida de control muscular); 4 (convulsiones coma); 5 (muerte)

Los resultados derivados de la validación de los hidrolizados, mostraron que se trataba de dos hidrolizados extensos aptos para la fabricación de fórmulas extensamente hidrolizadas, destinadas al tratamiento de APLV, desde un punto de vista nutricional y antigénico.

Caracterización antigénica y nutricional de la nueva fórmula

Caracterización de la fórmula terapéutica

En la Tabla 40 se detallan todos los parámetros analíticos relacionados con la reducida antigenicidad de la fórmula. El peso molecular medio de la fórmula terapéutica fue inferior a 1000 Da, y el máximo peso molecular encontrado de un tamaño de 2150 Da. El porcentaje en aminoácidos libres, definido por la proporción de pesos moleculares inferiores a 200 Da, fue del 3% y el porcentaje de péptidos pequeños del 97%.

Tabla 40. Parámetros relacionados con la reducción de antigenicidad de la fórmula terapéutica.

Parámetros analíticos	Valores	
Distribución de Pesos Moleculares	%	
> 3000 Da	0.00	
3000-1000 Da	36.00	
< 1000 Da	64.00	
Aminoácidos libres PM < 200 Da	3.00	
Peso Molecular medio Da	989	
Máximo peso molecular Da	2150	
Osmolalidad mOsm/kg	345	
Nitrógeno no proteico (% N total)	100	
Proteínas inmunoreactivas	mg/kg	µg/l
β-lactoglobulina	1.6	224
Caseínas	0.6	84

La osmolalidad de la fórmula cumplió con los criterios establecidos por AAP, es decir, valores inferiores a 400 mOsm/kg. La osmolalidad de esta fórmula fue ligeramente elevada debido al contenido en lactosa y no al de aminoácidos libres. El porcentaje de nitrógeno no proteico sobre nitrógeno total en esta fórmula, era del 100%, lo que nos indica un grado de hidrólisis elevado y sostiene la ausencia de trazas de proteínas. El contenido en proteínas inmunoreactivas (β-lactoglobulina y caseínas) analizado mediante ensayos ELISA, se aproxima al detectado en el análisis de los hidrolizados utilizados en su fabricación (ver Tablas 37 y 40).

Identificación de péptidos bioactivos en la fórmula

Se obtuvo un permeado con un contenido elevado de péptidos. Se seleccionaron en el cromatograma un total de 75 fragmentos peptídicos, de peso molecular inferior a 1000 Da (Tabla 41)(Figura 26):

Un 73% de los fragmentos procedían de proteínas séricas (51% β-lactoglobulina, 13% seroalbúminas, 12% lactoferrinas, 1% α-lactoalbúmina)

Un 27% de los fragmentos eran derivados de las caseínas (9.3 % α 1-caseínas, 1.3% α 2-caseínas, 9.3% β -caseínas y 2.7% κ -caseínas).

Un 50% de los péptidos inferiores a 1000 Da fueron fragmentos derivados de la β -lactoglobulina, sabiendo que esta proteína que constituye el 60% del suero (SCF 2003)

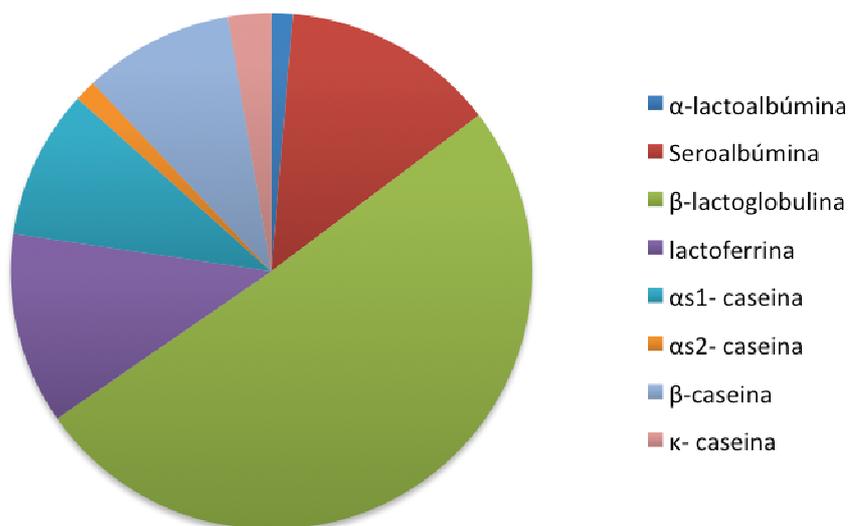


Figura 26. Origen proteico y proporción de péptidos (PM<1000 Da) en la fórmula terapéutica - HPLC-MS.

Los fragmentos peptídicos identificados en la base de datos BioTools (versión 2.1; Bruker Daltoniks) se resumen en las Tablas 42^a y 42^b.

14 fragmentos proteicos con actividad inhibidora de la ACE.

6 fragmentos derivados de la β -caseína.

8 fragmentos derivados de la β -lactoglobulina.

Un péptido, *VLNENL*, que podría albergar una capacidad inmunomoduladora y antibacteriana (Tabla 42^b)

Otros péptidos con actividad antiviral, antibacteriana, antimicrobiana (Tabla 42^b)

Tabla 41. Péptidos identificados en la fórmula terapéutica - HPLC-MS.

Fragmento Proteico	m/z	Peso observado Da	Carga	Proteína
SLAMA	493,1	492,1	+1	β -lactoglobulina
DLIWK	674,3	673,3	+1	lactoferrina
EILLQ	614,4	613,4	+1	β -lactoglobulina
IAVEKDAI	988,4	987,4	+1	seroalbúmina
SLAM	421,2	420,2	+1	β -lactoglobulina
IPAV	399,3	398,3	+1	β -lactoglobulina
PMGILR	687,4	686,4	+1	lactoferrina
KKADA	533,2	532,2	+1	lactoferrina
LDAQSAPL	814,3	813,3	+1	β -lactoglobulina
EMPFPK	748,3	747,3	+1	β -caseína
LSFNPTQ	806,3	805,3	+1	β -lactoglobulina
ASDISL	605,3	604,3	+1	β -lactoglobulina
AASDISL	676,3	675,3	+1	β -lactoglobulina
NSAEER	785,4	784,4	+1	α s1-caseína
EERLH	683,4	682,4	+1	α s1-caseína
ALPMHI	681,4	680,4	+1	β -lactoglobulina
IPAVFK	674,3	673,3	+1	β -lactoglobulina
TPEVDDEALEKFDK	818,3	1634,6	+2	β -lactoglobulina
VAGTWY	696,3	695,3	+1	β -lactoglobulina
IPMGILR	799,4	798,4	+1	lactoferrina
DKGACLL	719,3	718,3	+1	seroalbúmina
MEAES	646,3	645,3	+1	α s1-caseína
VVPPFLO	799,4	798,4	+1	β -caseína
SFNPTQL	806,3	805,3	+1	β -lactoglobulina
VRGPFPI	786,4	785,4	+1	β -caseína
ELSKDIGS	928,5	927,5	+1	α s1-caseína
PAVFKI	675,4	674,4	+1	β -lactoglobulina
VLVLDTDY	937,4	936,4	+1	β -lactoglobulina
TALVELLK	886,5	885,5	+1	seroalbúmina
LSFMAI	681,4	680,4	+1	κ -caseína
INTVQVT	775,4	774,4	+1	κ -caseína
IPAVF	546,3	545,3	+1	β -lactoglobulina
YLLFCM	789,3	788,3	+1	β -lactoglobulina
MGLIVN	646,3	645,3	+1	lactoferrina
EVDDEALE	919,5	918,5	+1	β -lactoglobulina
LSFNPTQL	919,5	918,5	+1	β -lactoglobulina
REKVL	645,4	644,4	+1	seroalbúmina
LHLPLP	689,4	688,4	+1	β -caseína
NLLRFF	809,3	808,3	+1	α s1-caseína
YLLFCMEN	1032,5	1031,5	+1	β -lactoglobulina
KFLDDDL	865,4	864,4	+1	α -lactoalbúmina
LHLPLPL	802,5	801,5	+1	β -caseína
DKLKHL	735,3	734,3	+1	seroalbúmina

Tabla 41 Continuación. Péptidos identificados en la fórmula terapéutica - HPLC-MS.

Fragmento Proteico	m/z	Peso observado Da	Carga	Proteína
KQIK	516,3	515,3	+1	seroalbúmina
LNENK	617,3	616,3	+1	β -lactoglobulina
NEINQ	617,3	616,3	+1	α 2-caseína
DTDYKK	769,3	768,3	+1	β -lactoglobulina
IHAQQK	724,3	723,3	+1	α 1-caseína
SLSQSK	649,3	648,3	+1	β -caseína
NYQEAK	752,2	751,2	+1	seroalbúmina
ALNENK	688,3	687,3	+1	β -lactoglobulina
AVEGPK	600,3	599,3	+1	seroalbúmina
QKKCQQW	948,4	947,4	+1	lactoferrina
LEPLQ	599,3	598,3	+1	lactoferrina
EAMAPK	647,3	646,3	+1	β -caseína
ISQPE	573,4	572,4	+1	lactoferrina
IIAEK	573,3	572,3	+1	β -lactoglobulina
LDTDYKK	882,4	881,4	+1	β -lactoglobulina
KIIAEK	701,4	700,4	+1	β -lactoglobulina
QLQGRK	729,4	728,4	+1	lactoferrina
TKIPA	529,3	528,3	+1	β -lactoglobulina
LVLIA	529,3	528,3	+1	seroalbúmina
IVTQTMK	820,4	819,4	+1	β -lactoglobulina
VLDTDYKK	981,4	980,4	+1	β -lactoglobulina
PTQL	458,3	457,3	+1	β -lactoglobulina
LEKFDK	779,4	778,4	+1	β -lactoglobulina
LDIQK	616,3	615,3	+1	β -lactoglobulina
IDALNENK	916,4	915,4	+1	β -lactoglobulina
KIDALNENK	1044,5	1043,5	+1	β -lactoglobulina
ALPMH	568,2	567,2	+1	β -lactoglobulina
VLNENL	701,4	700,4	+1	α 1-caseína
VLDTDYK	853,4	852,4	+1	β -lactoglobulina
KGLDIQ	673,4	672,4	+1	β -lactoglobulina
GLDIQK	673,4	672,4	+1	β -lactoglobulina
VASLRE	674,4	673,4	+1	seroalbúmina

Tabla 42^a. Péptidos bioactivos con actividad inhibidora de la ACE

Fragmento	m/z	Peso observado (Da)	Carga	Proteína	Funcionalidad	Referencia	Coincidencias (BioTools)
SLSQSK	649,3	648,3	+1	β -caseína	Fragmento del PPQSVLLSLSQSKVLPVPE con actividad inhibidora de la ACE	Yamamoto et al., 1994	31
EMPFK	748,3	747,3	+1	β -caseína	Inhibidor de la ACE	Pihlanto-Leppala et al., 1998	1
VVPPFLQ	799,4	798,4	+1	β -caseína	Fragmento del TPVVVPPFLQP con actividad inhibidora de la ACE	Abubakar et al., 1998	14
VRGPFPI	786,4	785,4	+1	β -caseína	Fragmento del VRGPFPIV con actividad inhibidora de la ACE	Miguel et al. 2006	1
LHLPLP	689,4	688,4	+1	β -caseína	Inhibidor de la ACE	Kohmura et al., 1989	34
LHLPLPL	802,5	801,5	+1	β -caseína	Inhibidor de la ACE	Miguel et al. 2006	12
IIAEK	573,3	572,3	+1	β -lactoglobulina	Lactostatina (hipocolesterolémico, inhibidor de la absorción de colesterol e inhibidor de la ACE)	Nagaoka et al., 2001; Janssen and Schalk, 2004; Prak et al., 2006	25
LDIQK	616,3	615,3	+1	β -lactoglobulina	Inhibidor de la ACE	Meisel et al., 2006	11
ALPMH	568,2	567,2	+1	β -lactoglobulina	β -lactoquinina. Inhibidor de la ACE	Mullally et al., 1996	5
VLDTDYK	853,4	852,4	+1	β -lactoglobulina	Inhibidor de la ACE	Pihlanto-Leppala et al., 2000	29
GLDIQK	673,4	672,4	+1	β -lactoglobulina	Inhibidor de la ACE	Pihlanto-Leppala et al., 1998	39
LDAQSAPL	814,3	813,3	+1	β -lactoglobulina	Fragmento del LDAQSAPLR con actividad inhibidora de la ACE	Pihlanto-Leppala et al., 2000	7
ALPMHI	681,4	680,4	+1	β -lactoglobulina	Posiblemente β -lactoquinina. Inhibidor de la ACE	Mullally et al., 1996	2
VAGTWY	696,3	695,3	+1	β -lactoglobulina	Actividad inhibidora de la ACE y antibacteriana	Pihlanto-Leppala et al., 1998; Pellegrini et al., 2001	29

Tabla 42^b. Péptidos bioactivos con actividad antimicrobiana, antiviral, antibacteriana, inmunomodulante.

Fragmento	m/z	Peso observado (Da)	Carga	Proteína	Funcionalidad	Referencia	Coincidencias (BioTools)
ISQPE	573,4	572,4	+1	lactoferrina	Fragmento del APRKNVRWCTISQPEW con actividad antibacteriana	Recio and Visser, 1999	54
DLIWK	674,3	673,3	+1	lactoferrina	Fragmento del EDLIWK con actividad antiviral	Siciliano R. et al. 1999	9
KQIK	516,3	515,3	+1	seroalbúmina	Ligera actividad antifúngica	Garibotto et al., 2010	18
VLNENL	701,4	700,4	+1	αs1-caseína	Fragmento del RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF con actividad antibacteriana e inmunomodulante	Lahov and Regelson, 1996; Hayes et al., 2007	6
NEINQ	617,3	616,3	+1	αs2-caseína	Fragmento del ALWKDILKNAGKAALNEINQLVNQG con actividad antimicrobiana	Charpentier S. et al., 1998	18
EAMAPK	647,3	646,3	+1	β-caseína	Fragmento del VKEAMAPK con actividad antioxidante	Korhonen and Pihlanto, 2007	14
DTDYK	769,3	768,3	+1	β-lactoglobulina		Doucet et al., 2003	20
ALNENK	688,3	687,3	+1	β-lactoglobulina		Doucet et al., 2003	13
LDTDYK	882,4	881,4	+1	β-lactoglobulina		Corzo-Martínez et al., 2009	29
KIIAEK	701,4	700,4	+1	β-lactoglobulina		Moreno et al., 2008	37
TKIPA	529,3	528,3	+1	β-lactoglobulina		Hernandez-Ledesma, et al., 2005	14
VLDTDYK	981,4	980,4	+1	β-lactoglobulina		Corzo-Martínez et al., 2009	17
LEKFDK	779,4	778,4	+1	β-lactoglobulina		Ortiz-Chao et al., 2009	13
IDALNENK	916,4	915,4	+1	β-lactoglobulina	Efecto proliferativo	Jacquot et al., 2010	25
KIDALNENK	1044,5	1043,5	+1	β-lactoglobulina		Pouliot et al., 2009	29
SLAMA	493,1	492,1	+1	β-lactoglobulina	Fragmento del WYSLAMA con actividad antioxidante	Hernandez-Ledesma, et al., 2007	25
SLAM	421,2	420,2	+1	β-lactoglobulina	Fragmento del WYSLAMA con actividad antioxidante	Hernandez-Ledesma, et al., 2007	14
IPAV	399,3	398,3	+1	β-lactoglobulina	Fragmento del IPAVFK con actividad antibacteriana	Pellegrini et al., 2001	6
ASDISL	605,3	604,3	+1	β-lactoglobulina	Fragmento del AASDISLLDAQSAPLR	Pellegrini et al., 2001	19
AASDISL	676,3	675,3	+1	β-lactoglobulina	Fragmento del AASDISLLDAQSAPLR	Pellegrini et al., 2001	50
IPAVFK	674,3	673,3	+1	β-lactoglobulina	Actividad antibacteriana	Pellegrini et al., 2001	19
VLVLDY	937,4	936,4	+1	β-lactoglobulina	Fragmento del VLVLDYK con actividad antibacteriana	Pellegrini et al., 2001	24
IPAVF	546,3	545,3	+1	β-lactoglobulina	Fragmento del IPAVFK con actividad antibacteriana	Pellegrini et al., 2001	53
LSFNPTQL	919,5	918,5	+1	β-lactoglobulina		Rahali et al., 2000	30
LSFMAI	681,4	680,4	+1	κ-caseína		Hernandez-Ledesma, et al., 2004	20
INTVQVT	775,4	774,4	+1	κ-caseína	Fragmento del MAIPPKNQDKTEIPTINTIASGEPTSTPTTEAVESTVATLEDSPVIESPPEINTVQVTSTAV con actividad antibacteriana	Malkoski et al., 2001	5

Ensayo clínico con lactantes con APLV

Se lleva a cabo un estudio de seguridad y capacidad nutricional de la nueva fórmula hipoalérgica; estudio abierto, prospectivo, multicéntrico y nacional. El protocolo del ensayo fue aprobado por el comité ético de investigación clínica, CEIC, del hospital Universitario de la Paz (Madrid). El comité científico asesor para el diseño del protocolo estuvo constituido por dos alergólogos y dos gastroenterólogos de prestigio internacional en pediatría. El periodo de inclusión abarcó desde Enero de 2010 a Febrero de 2011 y un segundo periodo de Enero de 2012 a Diciembre de 2012. Los reclutamientos se realizaron en los siguientes hospitales:

- Hospital Gregorio Marañón (Madrid)
- Hospital Vall de Hebrón (Barcelona)
- Hospital Infanta Sofía (Madrid)
- Hospital Universitario Virgen de las Nieves (Granada)

Durante el primer periodo de inclusión fueron reclutados un total de total de 27 lactantes, de los cuales 3 se excluyeron del análisis por no disponer de datos de seguimiento, (un caso por decisión de los padres, otro caso por anafilaxia y el tercer caso por decisión del médico). Se han analizado en total 24 lactantes con APLV mediada por IgE, de los cuales 6 abandonan de manera prematura, (2 por pérdida de seguimiento, 1 por decisión del pediatra, 1 por negación de ingesta, 2 por reacción adversa) y en el segundo mes de seguimiento abandonan dos pacientes más (uno por pérdida de seguimiento y otro por decisión del pediatra debido a una baja ingesta). Así pues, 16 lactantes con APLV completaron el periodo de seguimiento de 3 meses de duración.

Durante el segundo periodo de inclusión, Enero a Diciembre de 2012, fueron reclutados, 20 niños más. A todos ellos se les practico el test de prick y la prueba de provocación oral con la fórmula en estudio y 6 de ellos aceptaron comenzar con el seguimiento de 3 meses de duración. Las pruebas de provocación oral y test de prick con la fórmula terapéutica, resultaron negativos en todos los casos. Dos niños de 6 incluidos en el seguimiento, abandonaron una semana antes de los 3 meses;

uno por decisión de los padres, por regurgito y otro por una reacción de anafilaxia tras la introducción de la fruta. Completaron el seguimiento de 3 meses establecido en el protocolo un total de 22 pacientes de los 30 incluidos durante los dos periodos de inclusión (22 de 30, 73.3% la muestra) (Figura 27)

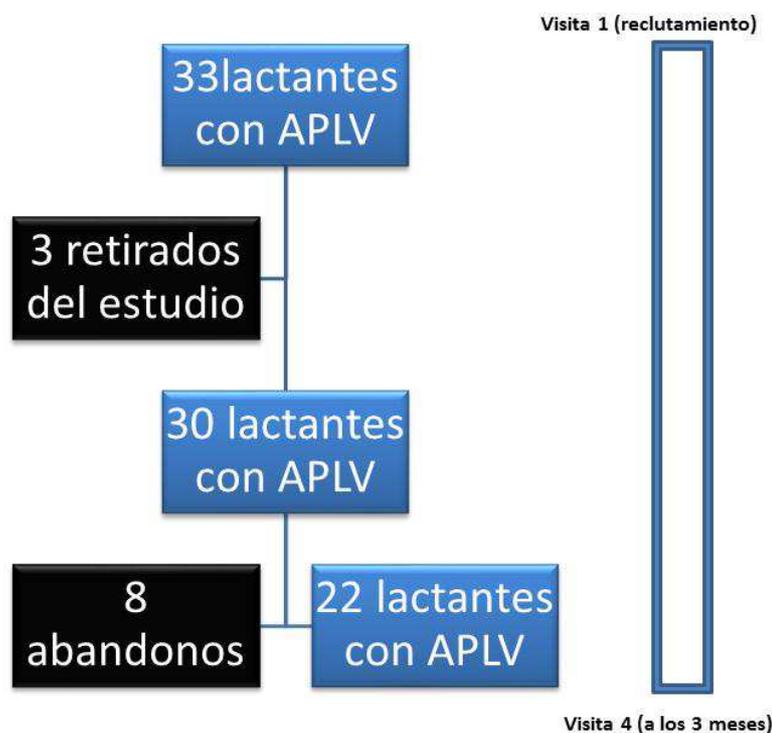


Figura 27. Reclutamiento y seguimiento de lactantes con APLV durante el periodo de seguimiento de 3 meses.

Características sociodemográficas

Los resultados son los siguientes y corresponden a los sujetos seleccionados durante el primer periodo de inclusión (Tabla 43):

- La edad media al iniciar el estudio era 4.3 ± 1.3 meses.
- El 62.5% de los pacientes eran niños y el 37.5 % niñas.
- El 62.5% de los pacientes no tenían hermanos en edad escolar.
- El 70.8% convivían en el hogar con 2 adultos.
- Más del 3% de los padres tenían estudios universitarios.
- El 20.8% de los lactantes convivían con fumadores activos.
- El 50% de los pacientes no tenían antecedentes de primer grado.
- El 20.8% tenían antecedentes de rinitis alérgica en la familia.

Tabla 43. Antecedentes familiares del lactante.

Características		n	%
Fumador activo	No	19	79.2
	Si	5	20.8
Antecedentes familiares			
	Dermatitis atópica	1	4.2
	Urticaria de repetición	2	8.3
	Rinitis alérgica	5	20.8
	Asma/Bronquitis asmática	2	8.3
	Gastroenteropatía	1	4.2
	Ausencia de antecedentes	12	50

Características clínicas y alimentación antes del seguimiento

Los datos clínicos antes de la inclusión en el estudio, de los lactantes con APLV reclutados durante el primer periodo, fueron los siguientes:

La edad gestacional media fue de 38.8 ± 1.7 semanas y el peso medio en el nacimiento de 3.3 ± 0.5 Kg. El 79.2% de los lactantes habían recibido lactancia materna exclusiva en algún momento desde su nacimiento; solo el 37.5% no recibieron ningún tipo de lactancia artificial. El 4.2% de los lactantes habían sido alimentados con lactancia materna exclusiva pasando a lactancia artificial exclusiva (Figura 28).

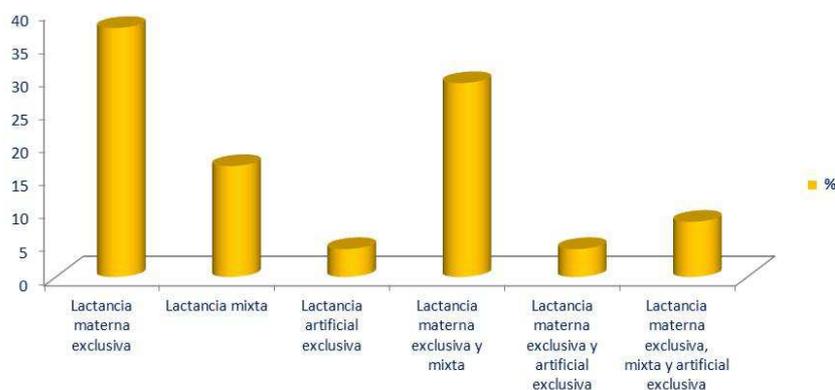


Figura 28. Tipo de alimentación desde el nacimiento hasta la inclusión en el estudio.

Los lactantes habían estado con lactancia materna exclusiva una media de 129.7 ± 26.7 días, con lactancia mixta 6.8 ± 8.2 días y con lactancia artificial exclusiva 13 ± 21.4 días (Tabla 44).

Tabla 44. Descripción de los días de lactancia materna, mixta y artificial.

Duración en días	Media \pm DE	Máximo	Mínimo	N
Lactancia materna exclusiva	129.7 \pm 26,7	120	180	90
Lactancia mixta	6.8 \pm 8,2	4	30	1
Lactancia artificial exclusiva	13 \pm 21,4	3	45	3

Respecto a la alimentación complementaria, el 33.3% de los lactantes con APLV, no había iniciado alimentación complementaria en el momento de iniciar el estudio. El 47.6% de los lactantes habían tomado cereales sin gluten, el 33.3% zumo de frutas, el 28.6% puré de verduras y el 19% pollo (Figura 29).

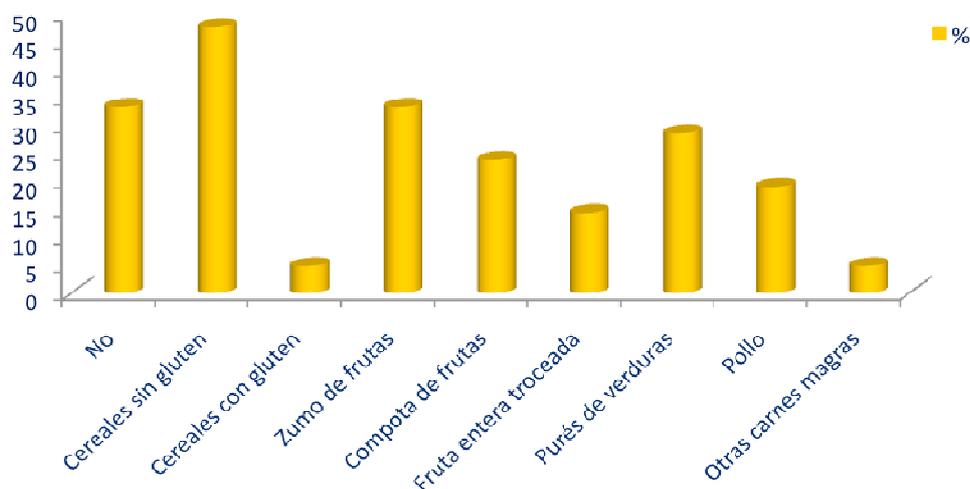


Figura 29. Alimentación complementaria hasta la inclusión.

En el momento del diagnóstico de APLV, la edad media (DE) de los lactantes fue de 4.1 ± 1.2 meses y habían transcurrido 1.6 ± 6.7 días entre el diagnóstico de la APLV y el inicio del estudio.

Los síntomas o signos de la APVL más frecuentes fueron erupción cutánea (95.8%) y prurito (41.7%) (Figura 30). El 62.5% de los lactantes habían experimentado más de un síntoma antes de la inclusión en el estudio.

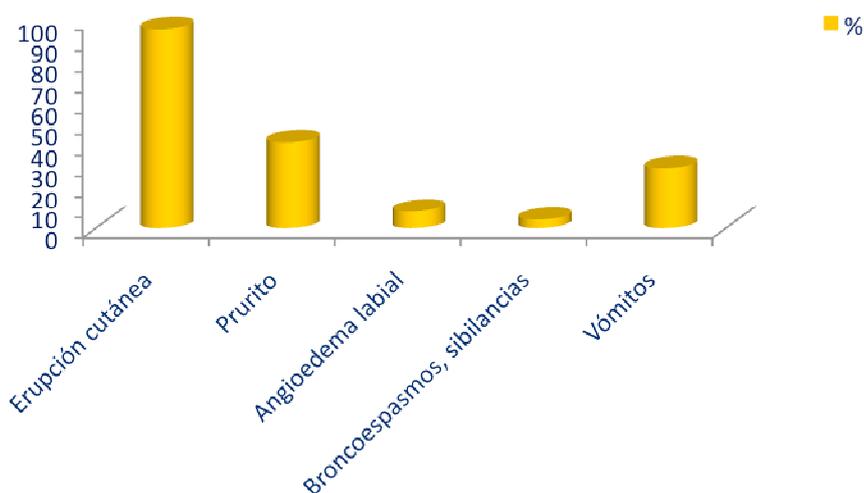


Figura 30. Descripción de los síntomas y signos antes de la inclusión.

En el diagnóstico de la enfermedad antes de la inclusión en el estudio, se utilizó tanto prueba clínica como cutánea y determinación de IgE en suero. La prueba de provocación oral a PLV se realizó al 79.2% de los lactantes y la prueba de provocación oral al hidrolizado del estudio al 95.8% de los casos (Tabla 45).

Tabla 45. Métodos para el diagnóstico durante el primer periodo de inclusión.

	n	%
Historia Clínica	24	100
Pruebas cutáneas/Prick Test	24	100
Determinación de IgE específica en suero	24	100
Prueba de provocación oral a las proteínas de la leche de vaca	19	79,2
Prueba de provocación oral a la fórmula hidrolizada en estudio	23	95,8

Las pruebas cutáneas realizadas para el diagnóstico de APLV dieron positivas (≥ 3 mm) en el 87.5% para β -lactoglobulina, en el 79.2% para LV, en el 83.3% en α -lactalbúmina y en el 70.8% para caseína (Figura 31).

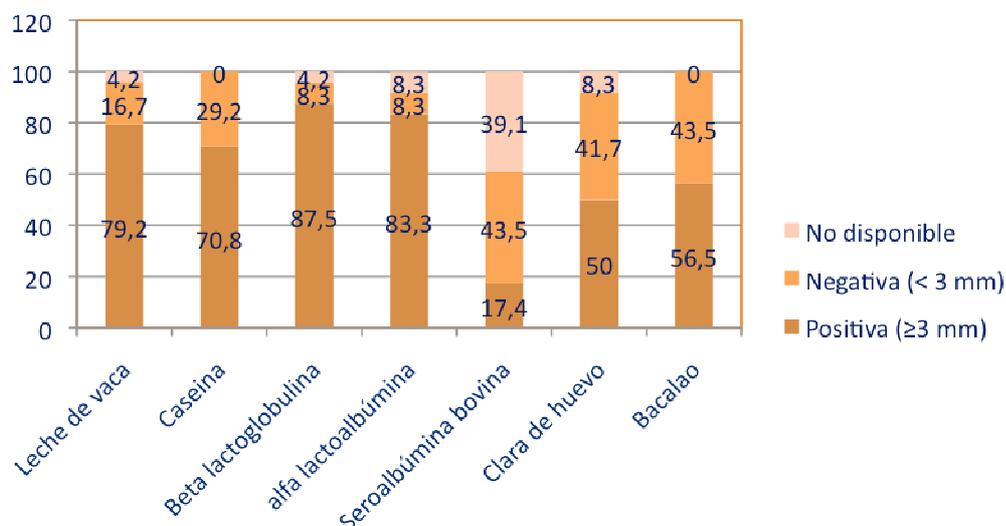


Figura 31. Resultados obtenidos en la prueba cutánea.

En la prueba para determinación IgE específica en suero, el 70.8 % de los pacientes dieron positivo ($>0,35$ kUA/L) en LV, el 62.5 % en β -lactoglobulina y α -lactalbúmina y el 45.8% en caseína (Figura 32).

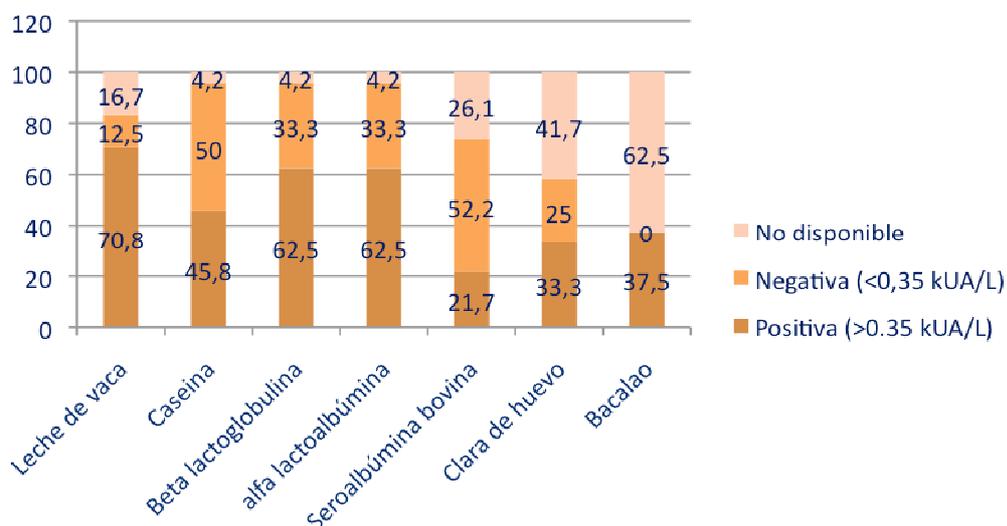


Figura 32. Resultados obtenidos en la determinación de IgE específica en suero.

Una vez finalizadas las pruebas de diagnóstico y comprobados los criterios de inclusión se procedió al comienzo del estudio clínico.

Resultados de la tolerancia y seguridad de la fórmula

La seguridad y tolerancia de la fórmula en lactantes con APLV, quedó establecida al someter a los lactantes diagnosticados, que cumplían con los criterios de inclusión, a la prueba de provocación con la fórmula terapéutica en estudio. De 44 sujetos solo 1 presentó una reacción inmediata de anafilaxia. El 97.7% de los lactantes alérgicos (43 de 44), toleraban la nueva fórmula.

La evaluación de la tolerancia también se describió mediante el porcentaje de pacientes con episodios de reagudización de APLV en cada visita de estudio. Los resultados derivados del estudio de tolerancia, de acuerdo al criterio médico, se encuentran descritos en la Tabla 46. En el primer mes de intervención, el 3.3% de los pacientes (1 paciente de los 30 reclutados), presentó episodios de reagudización de APLV según el criterio clínico. El 96.7% de los pacientes toleraban la fórmula. Transcurridos 2 y 3 meses desde el inicio del estudio, ninguno de los lactantes presentaban síntomas relacionados con la APLV según criterio médico (Tabla 46). Existieron 8 abandonos, 6 durante el primer periodo y dos durante el segundo periodo.

Tabla 46. Episodios de reagudización durante periodo de seguimiento.

Episodios de alergia según criterio médico			
		n	%
Al mes	Si	1	3.3
	No	29	96.7
	Total	30	100
A los 2 meses	Si	0	0
	No	22	100
	Total	22	100
A los 3 meses	Si	0	0
	No	22	100
	Total	22	100

Durante el primer periodo de seguimiento, un lactante experimentó una reacción adversa (erupción cutánea) y fue retirado del ensayo (Tabla 43). Otro lactante

también fue retirado del ensayo, por experimentar acontecimientos adversos durante el primer mes, aunque la relación con el consumo de la fórmula terapéutica era posible, no quedó demostrado este hecho (Tabla 47).

Tabla 47. Listado de acontecimientos adversos durante el estudio.

Sujetos (Código investigador - paciente reclutado)	Acontecimiento adverso	Visita	Intensidad	Relación	Acción / Resultado
008-02	Erupción cutánea inmediata a la toma	2 (al mes)	Moderada	Probable	Tratamiento fuera del estudio/resuelto
004-01	Vómitos	2 (al mes)	Leve	Posible	Cambio de leche/ Resuelto
	Dolor abdominal	2 (al mes)	Leve	Posible	

La relación posible se definió en el protocolo como la existencia de asociación temporal, pero la causa fue probablemente de otra etiología; no obstante, no podría descartarse la implicación del producto en estudio. En el caso de la erupción cutánea inmediata tras la toma, los padres acudieron a la consulta pediátrica del hospital donde fueron atendidos. En el caso de vómitos y dolor abdominal, se trató de síntomas/episodios referidos por los padres o tutores en el CRD. Al igual que en el caso de los resultados registrados a partir del CRD, el investigador en este caso ha de tener en cuenta la susceptibilidad de los padres, y la posible transgresión del tratamiento.

Las valoraciones a partir de los cuadernos de recogida de datos son secundarias, pues no todos los CRD fueron rellenados correctamente y algunos no fueron entregados; además se ha de tener en cuenta la existencia de susceptibilidad y subjetividad de los padres. Los resultados obtenidos a partir de las evaluaciones del CRD, durante el primer periodo de inclusión y seguimiento, son las siguientes:

El 20%, 22.2% y 14.3% presentaron episodios de APLV al primer mes, a los 2 y 3 meses respectivamente.

El síntoma más frecuente relacionado con los episodios de APLV fueron los vómitos.

Existió transgresión del tratamiento en el 25.9% de los casos. Se sospecha que hubo transgresión en el 3.7% de los casos y no existe información en el 29.6% de los casos.

En cuanto a la tolerancia de la fórmula y su seguridad, es importante conocer el aspecto, color y consistencia de las heces. En cuanto a las características de las heces, el 23.3% de los lactantes presentaron heces con consistencia normal durante el estudio, el 18.6% color normal, el 90.7% sin sustancias extrañas y el 93% aspecto normal (Figura 33).

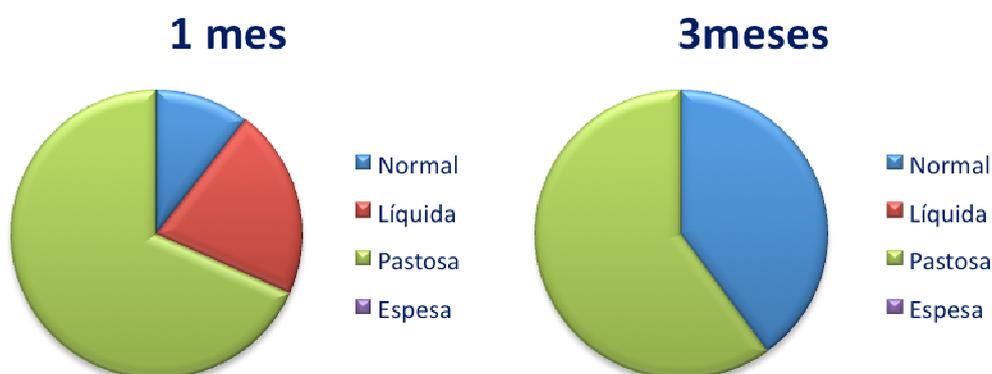


Figura 33. Consistencia de las heces.

Resultados de la valoración nutricional según ganancia pondero estatural

Los valores de peso, talla y perímetro cefálico al iniciar la lactancia con la nueva fórmula hipoalérgica se detallan en la Tabla 48.

Tabla 48. Peso, talla y perímetro cefálico al iniciar el estudio.

N 24 lactantes	Media±DE	Mínimo	Máximo	Mediana
Peso	7.26±1.27	4.20	7.40	9.60
Talla cm	64.42±3.96	55.00	65.00	74.00
Perímetro cm	41.65±2.12	35.00	42.00	44.00

A continuación en la Tabla 49, se detallan la ganancia de peso en kilogramos, talla en centímetros y perímetro cefálico en centímetros, al mes, a los 2 y 3 meses de seguimiento respectivamente, calculado como la diferencia entre la medida basal y la medida en cada visita.

En el primer mes de seguimiento, el peso medio ganado por los pacientes fue de 650 ± 370 gramos, a los dos meses de seguimiento de 990 ± 310 gramos y a los 3 meses de 1.420 ± 500 gramos.

En cuanto a la talla, los lactantes pasaron de 64.4 ± 4 cm al inicio del estudio a los 72.6 ± 3.5 cm a los 3 meses del inicio de la fórmula.

El perímetro cefálico de los 41.7 ± 2.1 cm iniciales a los 44.9 ± 0.9 cm al finalizar el seguimiento.

Tabla 49. Ganancia en peso, talla y perímetro cefálico respecto a visita basal durante el primer periodo de seguimiento.

	Media \pm DE	Mediana	n
Al mes			23
Peso g	650 ± 370	700	22
Talla cm	3.59 ± 2.72	4.00	23
Perímetro cm	1.16 ± 1.73	1.00	
A los 2 meses			
Peso g	990 ± 310	900	18
Talla cm	0.99 ± 3.12	5.50	18
Perímetro cm	5.50 ± 1.20	2.00	17
A los 3 meses			
Peso g	1420 ± 500	1250	16
Talla cm	7.38 ± 3.38	6.75	16
Perímetro cm	2.61 ± 0.85	2.00	15

En la Figura 34^a y 34^b se ha representado las curvas de crecimiento expresados mediante percentiles. Los puntos representan las medidas en la visita basal, al mes, a los dos meses y a los tres meses de seguimiento. Aunque existió heterogeneidad en las edades de la visita basal (menores de 2 meses hasta 6 meses) y sucesivas, se observa como el crecimiento durante los 3 meses de

seguimiento fue adecuado; en el caso de las niñas, los valores se encuentran por debajo de la mediana o percentil 50 y en el caso de los niños por encima del percentil 50. Ambos casos se encontraron próximos al percentil 50, no existiendo en ningún caso ni malnutrición (situada por debajo del percentil 10) ni riesgo de obesidad (por encima del percentil 97). La alimentación de los lactantes con APLV mediante la fórmula terapéutica junto con la alimentación complementaria, contribuyeron al correcto desarrollo y crecimiento del lactante durante los tres meses de seguimiento.

En las figuras 34^{c,d} se muestran las desviaciones estándar en peso, talla y perímetro cefálico, calculadas en las 4 visitas. En este caso, aunque existe heterogeneidad en la edad en cada visita, se observa la ganancia de peso, talla y perímetro cefálico desde la visita basal, siendo por tanto descartada toda posibilidad de estancamiento en el crecimiento; la alimentación de los lactantes con APLV mediante la fórmula terapéutica junto con la alimentación complementaria, están contribuyendo al correcto desarrollo y crecimiento del lactante

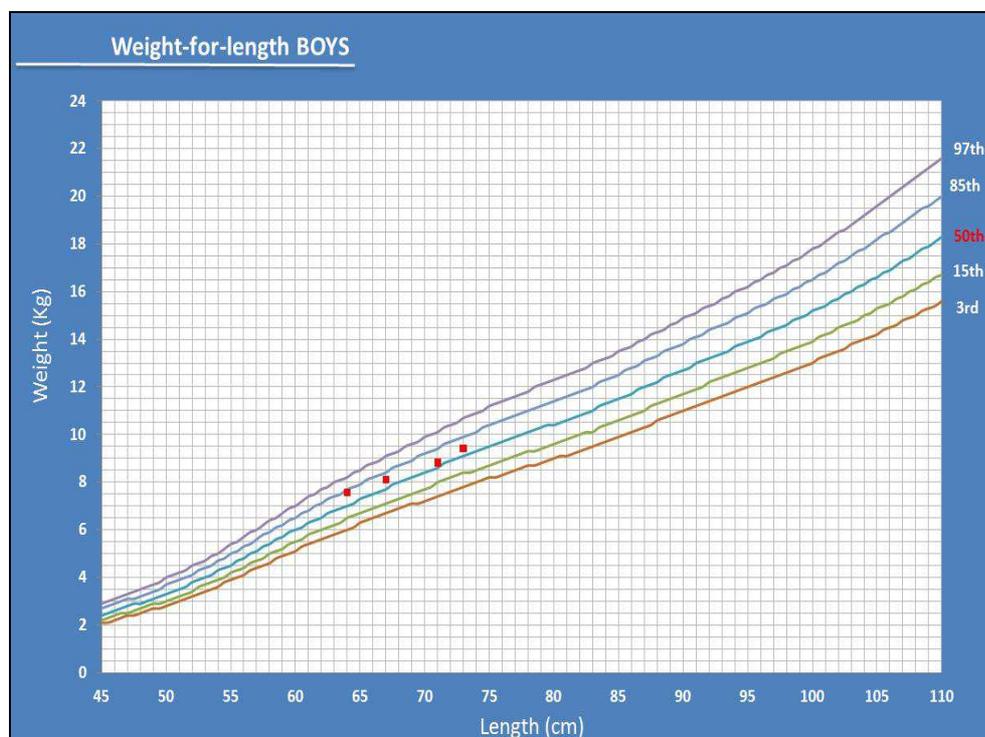


Figura 34^a. Evolución del peso-talla en cada visita del estudio según percentiles de las Tablas de crecimiento de la FAO-WHO. Sexo Masculino.

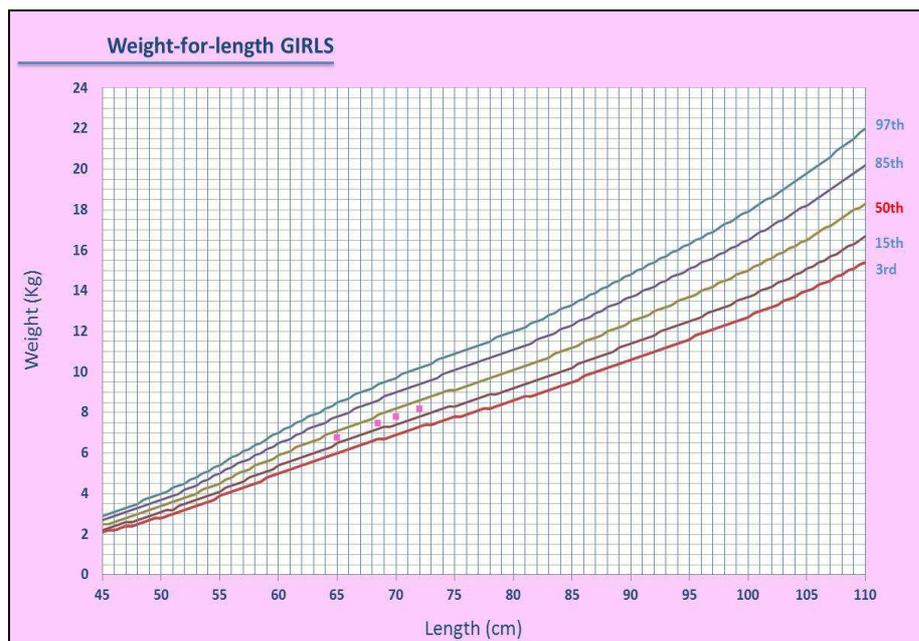


Figura 34^b. Evolución del peso-talla en cada visita del estudio según percentiles de las Tablas de crecimiento de la FAO-WHO. Sexo Femenino.

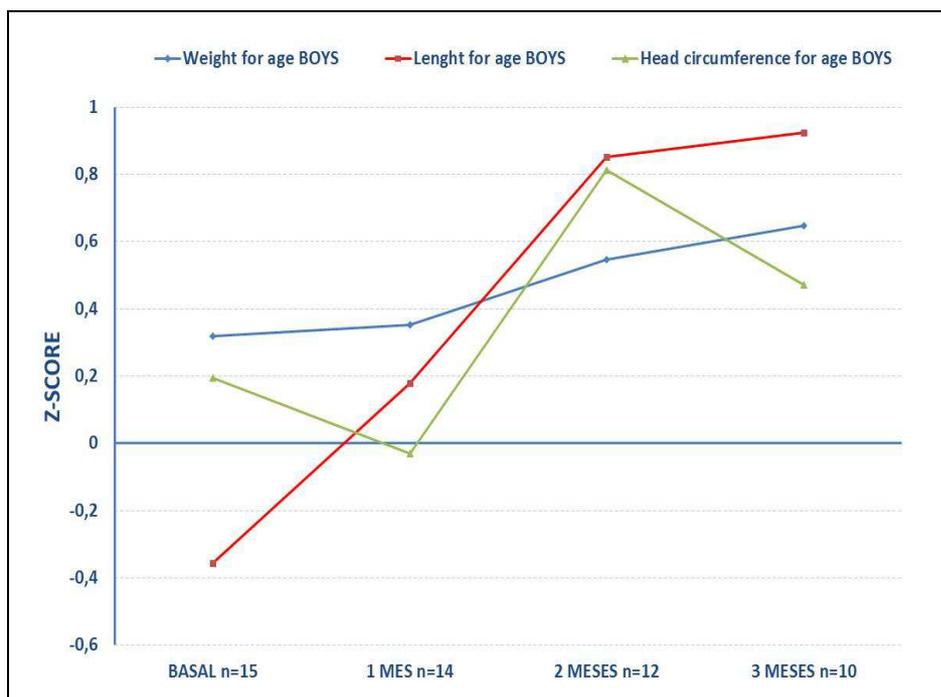


Figura 34^c. Desviaciones estándar en peso, talla y perímetro cefálico en cada visita del estudio. Sexo Masculino.

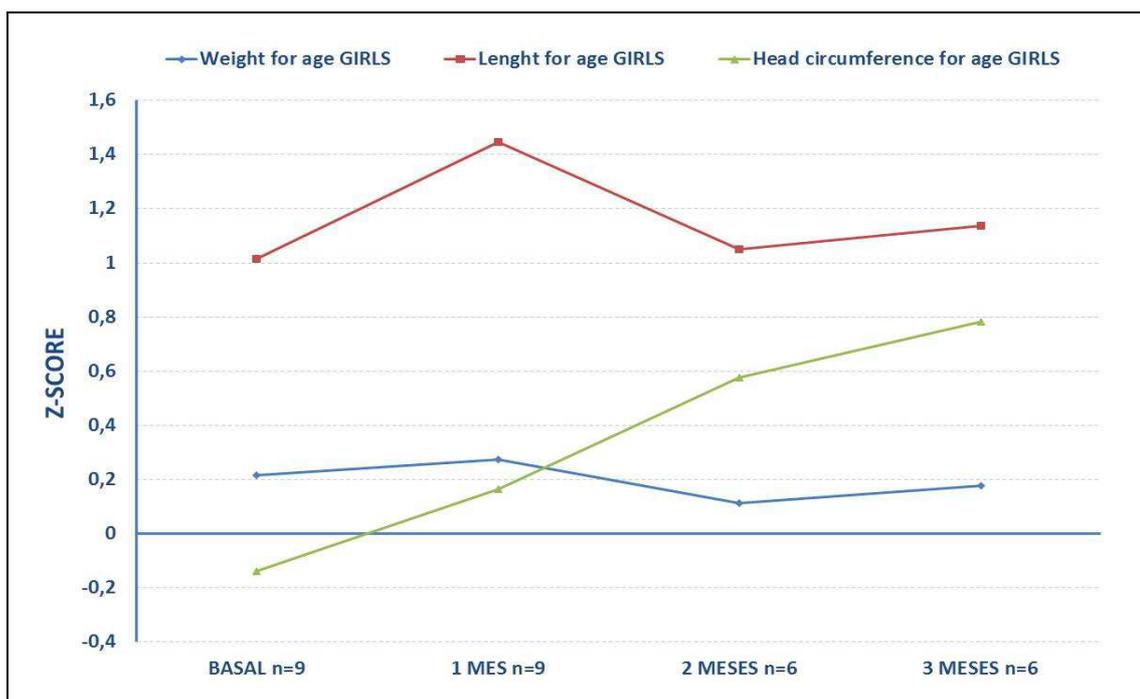


Figura 34^d. Desviaciones estándar en peso, talla y perímetro cefálico en cada visita del estudio. Sexo Femenino.

Resultados de la valoración nutricional – Parámetros bioquímicos

Se observaron valores similares tanto en la visita basal como en la visita final del estudio, sin diferencias estadísticamente significativas (Tabla 50). Solamente la vitamina B12 mostró un aumento estadísticamente significativo, pasando de un valor de 383.9 ± 248.2 pg/ml a los 492.6 ± 226.5 pg/ml al finalizar el estudio ($p=0,004$).

Tabla 50. Parámetros bioquímicos y hematológicos correspondientes a la visita basal y a los 3 meses de intervención.

	Visita 1 - Basal Media ± DE	Visita 4 - a los 3 meses Media ± DE
Hemoglobina g/dl	11.09±0.94	11.42±0.78
Hematocrito %	32.47±2.80	33.90±2.38
VCM fL	79.19±6.32	71.66±14.19
Leucocitos cel/mm ³	10560.00±2060.44	11836.36±4217.07
Eosinófilos cel/mm ³	1457.54±2570.21	417.39±402.98
Ferritina ng/ml	57.59±61.91	32.45±28.3
Transferrina mg/dl	269.13±45.79	264.00±41.66
Ácido fólico ng/ml	17.31±3.62	19.68±4,92
Vitamina B12 pg/ml	383.94±248.23	492.64±226.46
Albúmina g/dl	4.39±0.40	4.59±0.27
Calcio total mg/dl	9.76±2.31	9.53±3.00

En el recuento de eosinófilos, parámetro que aun no teniendo relación con la valoración nutricional, se considera importante desde el punto de vista de la tolerancia o recuperación de la respuesta alérgica, se observaron al comienzo del estudio, valores muy altos. Resultaron incluso por encima de los valores considerados como límite máximo (0 - 700 células/mm³), presentando la mayoría de los sujetos eosinofilia, indicando este hecho como el estado alérgico del sujeto provoca un aumento de la respuesta eosinófila; sin embargo, tras 3 meses de tratamiento, estos valores vuelven a encontrarse dentro del rango establecido (Tabla 50).

Consumo medio de la formula terapéutica

Los lactantes del estudio consumieron una media de 345.4±227 ml diarios. En algunos casos no se rellenaron todos los días el CRD, se calculó de nuevo la cantidad de leche consumida considerando que no habían recibido leche hipoalérgica el día que no se anotó en el diario. De esta manera, la cantidad diaria media (DE) consumida por los lactantes de estudio era de 283.8±220.5 ml. La cantidad diaria de fórmula real consumida estaba entre los 280 y 350 ml/diarios. Solamente un lactante no recibió alimentación complementaria junto a la leche hipoalérgica durante el estudio y otros continuaron con la lactancia materna y la fórmula en estudio.

De acuerdo con estos resultados, la validación antigénica y nutricional de la fórmula terapéutica es correcta, pues cumple los criterios exigidos por *ESPGHAN* y *AAP*. La fórmula es segura y podría ser comercializada, para el tratamiento nutricional de lactantes con APLV.

Experimento 2. Estatus nutricional de los AGPI-CL ω -3 y ω -6

Se evaluaron los contenidos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, AGPI-CL, DHA y AA, en la membrana de los eritrocitos procedentes de ocho lactantes diagnosticados con APLV, antes de comenzar el ensayo y transcurridos tres meses de tratamiento nutricional con la fórmula terapéutica. Es importante destacar que en nuestro ensayo no existió un grupo placebo, es decir, un grupo de lactantes con APLV alimentado con una fórmula desprovista de DHA, pues no era el objetivo principal de este estudio saber si el DHA era un nutriente condicionalmente esencial en lactantes nacidos a término. El objetivo fue aportar DHA a través de la fórmula, para lograr unos niveles en la membrana de los eritrocitos, similares a los encontrados en niños amamantados y estudiar si existía una relación con la disminución de la respuesta alérgica. Los principales resultados fueron los siguientes:

No existieron cambios estadísticamente significativos en las concentraciones de DHA y AA en la membrana de los eritrocitos, entre el inicio del estudio y transcurridos los 3 meses de tratamiento.

Se observó una tendencia al aumento de los contenidos de AA y DHA en la membrana de los eritrocitos con el tiempo (AA: 5.61 ± 2.11 vs 7.57 ± 1.51 ; DHA: 4.50 ± 1.28 vs 5.94 ± 1.01) (Figura 35, Tabla 51).

Tabla 51. Porcentaje de DHA, AA, EPA, LA y LNA en la membrana de los eritrocitos de lactantes con APLV

	Visita 1 - Basal Media \pm DE n=8	Visita 4 - a los 3 meses Media \pm DE n=8
DHA	4.50 \pm 1.28	5.94 \pm 1.01
AA	5.61 \pm 2.11	7.57 \pm 1.51
AA/DHA	1.25	1.24
EPA	1.59 \pm 0.68	1.73 \pm 0.50
LA	9.99 \pm 2.44	10.31 \pm 1.18
LNA	1.16 \pm 0.68	1.05 \pm 0.57
LN/LNA	8.62	9.80

Los ácidos grasos esenciales AGEs, LA (18:2 ω -6) y LNA (18:3 ω -3) fueron aportados principalmente a través de la fórmula terapéutica, en concentraciones establecidas en la Directiva 2006/141/CE. Las concentraciones de estos ácidos en la membrana de los eritrocitos, antes del tratamiento y transcurridos los tres meses de seguimiento, se mantiene prácticamente sin variaciones (LA: 9.99 ± 2.44 vs 10.31 ± 1.18 ; LNA: 1.16 ± 0.60 vs 1.05 ± 0.57) (Figura 36).

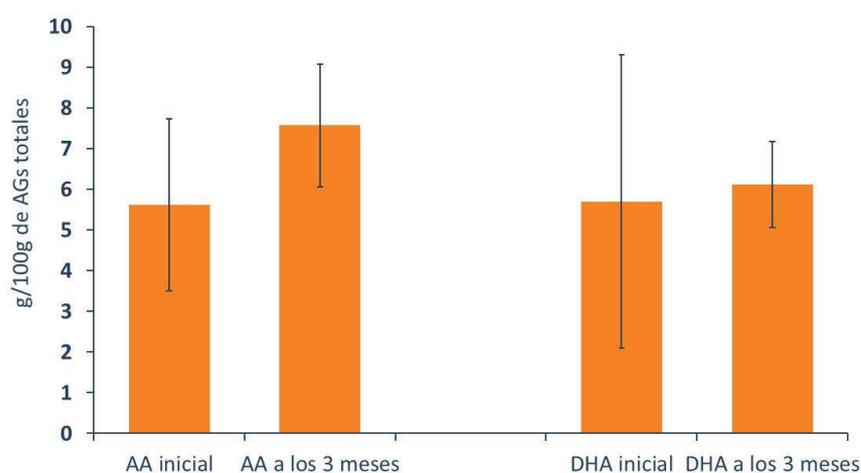


Figura 35. Porcentaje de DHA y AA del total de ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos.

La proporción LA/LNA en la membrana de los eritrocitos antes y después del tratamiento tendió a aumentar con el tiempo (Tabla 47).

La proporción AA/DHA no experimentó cambios significativos en el tiempo (Tabla 47).

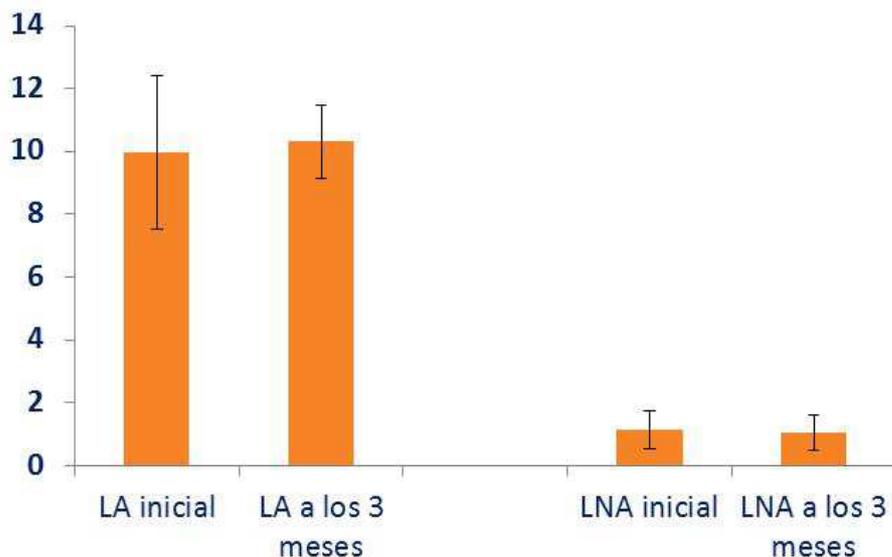


Figura 36. Porcentaje de LA y LNA del total de los AGs en la membrana de los eritrocitos.

Los ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, los contenidos con respecto al total de ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos no experimentaron cambios significativos con el tiempo (Tabla 52).

Tabla 52. Porcentaje de saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, ω -3 y ω -6 en la membrana de los eritrocitos de lactantes con APLV.

	Visita 1 - Basal Media \pm DE	Visita 4 - a los 3 meses Media \pm DE
Saturados	41.45 \pm 3,01	40.84 \pm 1,14
Monoinsaturados	23.40 \pm 2,80	23.86 \pm 3,13
Poliinsaturados	33.99 \pm 4,53	34.25 \pm 3,56
Sat:Mono	1.79 \pm 0.21	1.74 \pm 0.23
Total ω -6	25.59 \pm 4.73	25.97 \pm 4.08
Total ω -3	8.87 \pm 4.96	8.99 \pm 1.51

Experimento 3. Biomarcadores de tolerancia antigénica

En nuestro trabajo, se determinaron los niveles de citocinas en plasma antes y después del tratamiento nutricional con la fórmula terapéutica, en 8 lactantes con

APLV. Los resultados, expresados como media \pm error típico en pg/ml, e intervalo de confianza para la media al 95%, se encuentran en la Tabla 53.

Tabla 53. Análisis de las principales citocinas en plasma de lactantes con APLV.

Citocinas en plasma pg/ml	Visita 1 - Basal n=8		Visita 4 - A los 3 meses n=8	
	Media±error típico	Intervalo de confianza	Media±error típico	Intervalo de confianza
IL-4	nd	nd	nd	nd
IL-13	nd	nd	nd	nd
IL-17A	2.36±0.47	1.21-3.50	1.72±0.55	0.41-3.02
IL-8	33.78±22.58*	-24.37- 91.84	5.66±1.40*	2.13-9.00
IFN- γ	8.88±3.70	0.13-17.6	6.76±2.07	1.18-11.68
IL-10	8.91±2.37	3.30-14.51	11.38±3.21	3.79-18.96
TGF- β	30.46±5.42	17.64-43.28	19.89±5.95	5.82-33.96

nd: No detectadas o por debajo del límite de detección del método.

Los principales resultados se encuentran descritos en la Tabla 53 y figura 37, fueron los siguientes:

No existieron cambios estadísticamente significativos en el tiempo, debido al tratamiento nutricional en ninguna de las citocinas estudiadas, salvo en IL-8. Existieron limitaciones debido a la variabilidad de las medidas, las elevadas desviaciones estándares y el pequeño tamaño de muestra.

La citocina IL-8, marcador de inflamación intestinal, disminuye significativamente con el tiempo, es decir, a los tres meses de tratamiento (media±error típico: 33.78±22.58 vs 5.66±1.40 pg/ml, U de Mann Whitney U p=0.03)(Tabla 53)

Las citocinas IL-4 e IL-13, citocinas relacionadas con la respuesta linfocitaria T_H2 o alérgica, se encontraron por debajo del límite de detección, es decir, a

concentraciones inferiores a 3.2 pg/ml. Por lo tanto, los niveles de estas citocinas en plasma son muy bajos pudiendo ser debido a que estas citocinas no son detectadas prácticamente en plasma, al ser sujetos que comienzan a ser tratados con nuestro hidrolizado tras haber utilizado otro hidrolizado o, al menos haber abandonado la fórmula a base de LV que les provocaba la respuesta alérgica; por lo tanto, la reacción alérgica está minimizada y así se sigue manteniendo durante el consumo de nuestro hidrolizado en estudio.

Desde el punto de vista analítico, las medidas de IL-4 e IL-13 en plasma, mediante la tecnología Luminex, no fueron de gran ayuda, pues el límite de detección es superior a los niveles de estas citocinas en lactantes sanos encontrados en bibliografía: IL-4: 0.23 ± 0.24 pg/ml; IL-13: 1.3 ± 1.0 pg/ml (datos tomados de *Koike et al., 2011*)

Se observó como la interleucina IL-10, citocina potencialmente inmunoreguladora, tiende a aumentar a los tres meses de tratamiento (8.91 ± 2.37 vs 11.38 ± 3.21), aunque no así la TGF- β .

Las citocinas IL-17A e IFN- γ tienden a disminuir)(Tabla 53)

No se encontraron correlaciones significativas entre los niveles de citocinas en plasma y la presencia de DHA en la membrana de los eritrocitos.

Se observó una tendencia a aumentar en citocina reguladora IL-10, la disminución de IL-8 y la tendencia al aumento de los niveles de DHA en los eritrocitos. De nuevo, los factores limitantes fueron el tamaño de muestra y la amplia variabilidad en los valores de las citocinas, así como la variabilidad en la ingesta de la fórmula terapéutica, pues muchos de ellos mantuvieron la lactancia materna durante el tratamiento.

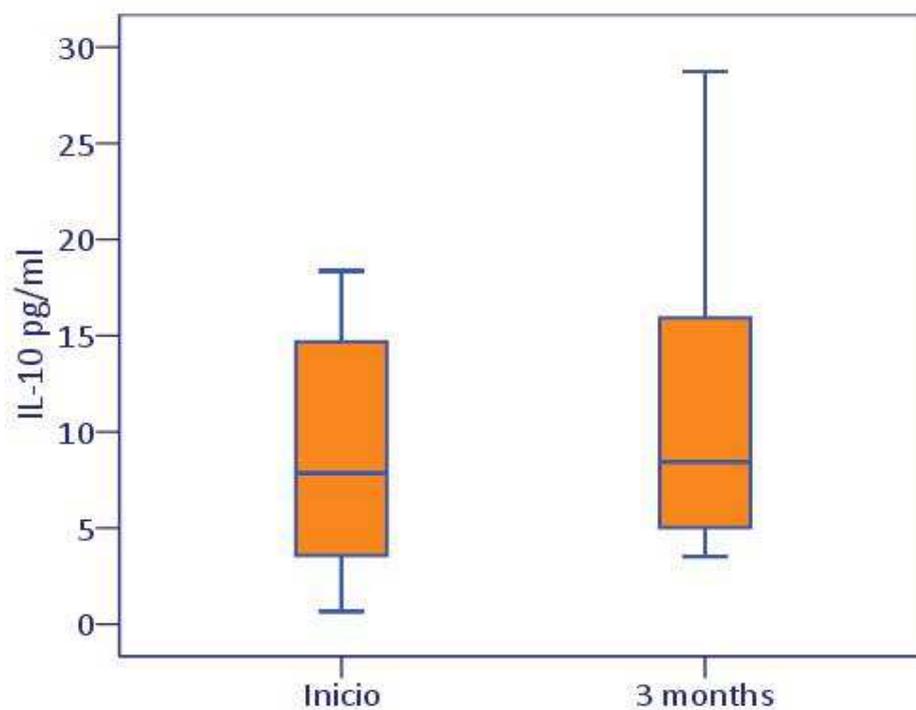
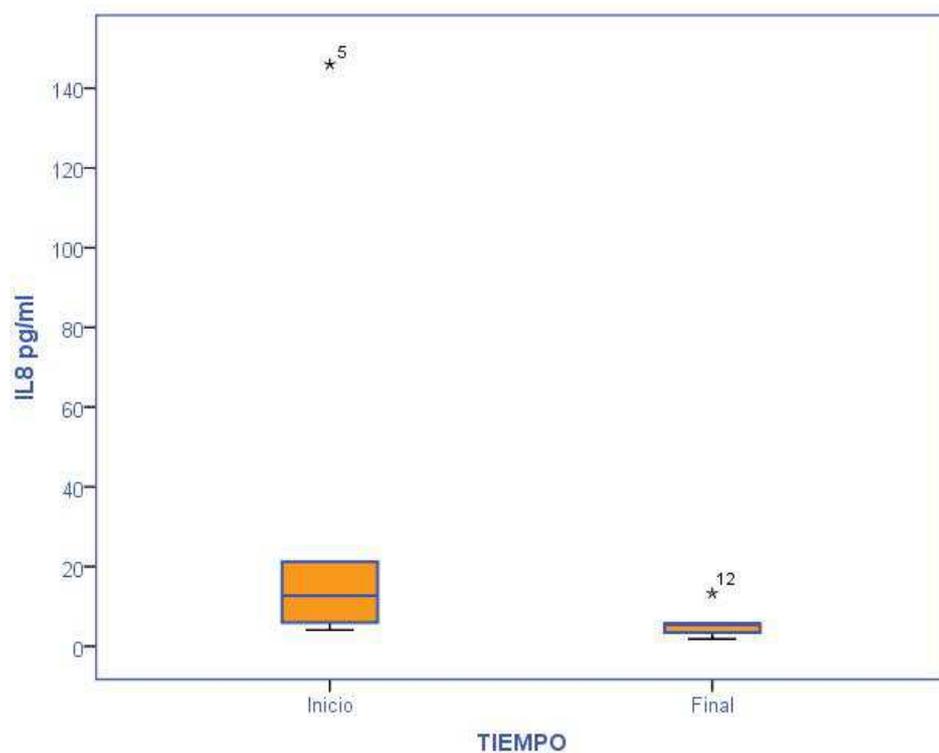


Figura 37. Niveles de citocinas en plasma, de lactantes con APLV, antes y después del seguimiento. Mediana, valor máximo, valor mínimo

Las enfermedades alérgicas son un problema global de salud pública. Entre un 30% a un 40% de la población mundial presenta una o más alergias, siendo el aumento de la prevalencia más acusado en la población infantil y juvenil. Según el libro blanco de la Organización Mundial de Alergias, *WAO* en sus siglas inglesas, entre 250 a 300 millones de personas en el mundo sufren alergias alimentarias (*WAO 2011*). Por tanto es necesario disminuir la carga de esta enfermedad mediante la prevención, estableciendo guías basadas en la evidencia, realizando estudios epidemiológicos y diseñando programas de actuación. Concretamente en el caso de las APLV, la *WAO* (*Fiocchi et al., 2010*) y *ESPGHAN* (*Koletzko et al., 2012*) han publicado recientemente guías de diagnóstico y tratamiento. El aumento de las alergias alimentarias pone de manifiesto la necesidad de seguir investigando, con la finalidad de establecer una respuesta adecuada a este problema de índole mundial. Para ello, es necesario que los gobiernos tomen conciencia de las consecuencias económicas de la morbilidad y los gastos que conlleva esta enfermedad.

La marcha atópica comienza el primer año de vida con el desarrollo de la APLV remitiendo en la mayoría de los casos antes de los dos años de edad. Sin embargo, estos niños tienden a experimentar otras formas de alergia conforme crecen y aumenta el contacto con alérgenos alimentarios, aeroalérgenos y otros contaminantes. La prevalencia de alergias alimentarias en la infancia, y concretamente la APLV, ha aumentado en las últimas décadas (*Sicherer et al., 2011; Prescott y Alleen, 2011*). En el caso de la APLV el tratamiento con hidrolizados extensos, al igual que con dietas elementales, ha sido sobradamente demostrado. Ingredientes funcionales como prebióticos, probióticos y DHA se han introducido, en las dos últimas décadas, en las fórmulas diseñadas para el tratamiento nutricional de lactantes con alergia. Sin embargo, parece que las estrategias nutricionales en la prevención terciaria no son del todo efectivas (*Torres et al., 2011*). Actualmente la investigación se dirige a conocer el papel de estos ingredientes en el tratamiento y la prevención.

Con el desarrollo de este trabajo intentamos colaborar en la prevención terciaria (evitar la reaparición de nuevos síntomas en niños que ya los han presentado anteriormente) y actuar directamente sobre la marcha atópica, elaborando un alimento especial capaz de modular y educar el sistema inmunitario del lactante,

además de satisfacerlo desde el punto de vista nutritivo. Es la primera vez que se estudia el posible efecto beneficioso de los AGPI-CL (DHA y AA) en la prevención terciaria, en la modulación de la respuesta a la APLV pues, hasta ahora, los trabajos publicados solo han tratado el papel del DHA en la prevención primaria de alergias y asma.

Caracterización antigénica y nutricional de la fórmula

El único tratamiento posible para la APLV durante el primer año de vida, es evitar la ingesta de dicha proteína mediante la lactancia materna y, en aquellos casos que no sea posible, se recurrirá a las fórmulas extensamente hidrolizadas o elementales, durante los primeros seis meses de vida (*Comité de Nutrición de la AEP 2001; Vandenplas et al., 2007; Host et al., 2008; Fiocchi et al., 2010*) o el empleo de fórmulas de soja a partir de los seis meses de vida. Sin embargo, sobre la utilización de fórmulas de soja aún existe controversia (*Comité de Nutrición de la ESPGHAN, 2006*); no se debe utilizar en el caso de alergias no mediadas por IgE ni cuando existan síntomas gastrointestinales, enteropatía o malabsorción (*Comité de Nutrición de la AEP, 2001; Comité de Nutrición de ESPGHAN, 2006; Goicoechea et al., 2009; WAO, Fiocchi et al., 2010*)

Las fórmulas extensamente hidrolizadas aparecen en las guías sobre recomendaciones para el tratamiento nutricional de la APLV como primera opción (*ESPGHAN, Host et al., 1999; Comité de Nutrición de la AAP, 2000; Vandeplass et al., 2007; Fiocchi et al., 2010; Koletzko et al., 2012*). Es por ello que en este trabajo se consideró la utilización de una nueva fórmula, extensamente hidrolizada, como vehículo para intervenir en la prevención terciaria de la APLV. Antes de la comercialización de este tipo de fórmulas es necesaria la validación nutricional y de antigenicidad de la fórmula, según criterios establecidos por distintos organismos científicos (*SCF 1991; Comité de Nutrición de AAP 2000; ESPGHAN, Comité de Nutrición 1999*). Sin embargo, no todas las fórmulas etiquetadas como hipoalergénicas que encontramos en el mercado cumplen dichos criterios; se desconocen en algunos casos los datos clínicos para sostener dicha alegación; aún existe un gran vacío legal (*Muraro, 2011*).

Caracterización de los hidrolizados y la fórmula terapéutica

Es importante comprobar la ausencia de proteínas o agregados lácteos de elevado peso molecular, así como el contenido en proteína inmunoreactiva (SCF 1993, ESPGAN 1993). Así pues, una fórmula con alto grado de hidrólisis debe tener un 100% de péptidos con un peso molecular inferior a 5.000 Da (Goicoechea et al., 2009); ya que, conforme aumenta el peso molecular aumenta la alergenicidad (Comité de nutrición de la AEP, 2001). Nuestros resultados mostraron una distribución molecular característica de este tipo de fórmulas hidrolizadas, con pesos moleculares inferiores a 3000 Da. Trabajos previos al nuestro, utilizando la misma técnica cromatográfica (cromatografía de filtración en gel o de exclusión molecular), observan también una distribución de pesos moleculares inferiores a 3000 Da en los hidrolizados de alto grado de hidrólisis, siendo en todos ellos el porcentaje de pesos moleculares inferiores a 1000 Da, superior al 80% (Fujinari y Manes, 1997; Boza et al., 1995).

En nuestro trabajo los hidrolizados utilizados en la fabricación de la fórmula presentaron un grado de hidrólisis superior al 29% y un porcentaje de pesos moleculares inferior a 1000 Da del 64%, encontrándose el 36% restante en el rango comprendido entre los 1000 a 3000 Da. En un trabajo anterior al nuestro, González-Tello et al. observan que sometiendo un suero proteico a un grado de hidrólisis superior al 20%, la distribución de pesos moleculares, usando el mismo método de detección empleado en nuestro trabajo, se sitúa por debajo de los 1000 Da (González-Tello et al., 1994). Además, nuestros resultados fueron semejantes a los observados también en un hidrolizado sérico extenso (7.42% de 1000-3000 Da y 92.55% inferior a 1000 Da) (Boza et al., 1995) y a la distribución de una fórmula extensamente hidrolizada, con caseína:suero 40:60, que contiene un 89% de péptidos con peso molecular inferior a 1000 Da (Reche et al., 2010).

Fristché (2003) analizando la distribución de pesos moleculares en fórmulas hipoalergénicas, encuentra un peso molecular medio de 850 Da en el caso de una fórmula con hidrolizado de suero, 390 Da en el caso de una fórmula comercializada de hidrolizado de caseína y un peso molecular medio de 140 Da en una fórmula elemental. En nuestro estudio, el peso molecular medio de la fórmula terapéutica

fue inferior a 1000 Da, siendo el peso molecular máximo de un tamaño de 2150 Da y el porcentaje de aminoácidos (PM<200Da) inferior al 3%. Estos resultados pusieron de manifiesto que la distribución de pesos moleculares dependía de la proteína nativa utilizada, el grado de hidrólisis, las enzimas utilizadas en la hidrólisis, pH y temperatura, entre otros factores (*González-Tello et al., 1994; Monaci et al., 2006; Fiocchi et al., 2010*).

Otros grupos de investigadores, analizando la distribución de pesos moleculares en fórmulas hipoalergénicas extensamente hidrolizadas del mercado, detectan fragmentos con pesos moleculares comprendidos entre 7000 a 14000 Da, pudiendo ser estos compuestos proteína intacta o agregados formados durante el procesado de las fórmulas (*Rosendal y Barkholt, 2000; Monaci et al., 2006*). La distribución de pesos moleculares que se observó en nuestra fórmula (PM<3000Da) puso de manifiesto que durante el tratamiento térmico al que es sometida durante la fabricación de la misma no se originaron agregados de epítomos alergénicos. La mayoría de trabajos publicados sostienen que la determinación de la distribución de pesos moleculares en las fórmulas hipoalergénicas es una herramienta útil para conocer la alergenicidad residual de la fórmula; sin embargo, no es suficiente para su caracterización, ya que es necesaria la utilización adicional de ensayos inmunoenzimáticos. La especificidad de los anticuerpos en la detección de proteínas, en este caso de origen lácteo, hace que estos métodos sean mucho más sensibles y específicos (*Monaci et al., 2006*).

Docena et al. (2002) analizan mediante un método ELISA competitivo, el contenido de proteína láctea en LV, leche materna, fórmulas elementales e hidrolizadas. El resultado que observan es 4730, 1.93, 0.011, 0.34 mg/l. El contenido en proteína inmunoreactiva de la fórmula terapéutica en nuestro estudio fue de 0.31 mg/l, similar al observado en una fórmula extensamente hidrolizada de caseína y 105 veces inferior al contenido que encontrado en la LV en el trabajo realizado por Fristché (2003). Concretamente, el contenido en β -lactoglobulina en nuestra fórmula fue de 224 μ g/l, mientras que en la LV es de 4×10^6 μ g/l y en la leche materna oscila entre 0.9 - 150 μ g/l según resultados publicados (*Host y Halcken, 2004*).

La osmolalidad es un parámetro relevante en este tipo de productos. La AAP recomienda que las fórmulas infantiles no superen los 400 mOsm/kg (AAP, 1976). Además, según esta misma academia, los hidrolizados proteicos utilizados en las fórmulas para lactantes con APLV, deben contener un bajo contenido de aminoácidos, pues su presencia aumenta el sabor amargo y la osmolalidad; a su vez, deben contener un alto contenido en di y tri-péptidos fácilmente absorbibles en el intestino (AAP, 1976; Boza et al., 1994). En nuestra fórmula se detectó una osmolalidad de 345 mOsm/kg, resultando ser ligeramente más elevada que otras fórmulas extensamente hidrolizadas (Pereira et al., 2008). En este tipo de fórmulas el grado de hidrólisis y el tipo de hidratos de carbono (lactosa, glucosa, maltodextrinas) son factores determinantes de la osmolalidad; así pues, una fórmula extensamente hidrolizada de suero que contiene 52% de lactosa y 48% de maltodextrinas posee una osmolaridad de 302 mOsm/l mientras que el mismo hidrolizado, formulado con maltodextrinas como única fuente de carbohidratos, posee menor osmolaridad 195 mOsm/l. Las fórmulas extensamente hidrolizadas analizadas en el trabajo de Pereira et al. (2008) no contienen lactosa; sin embargo, en nuestra fórmula el principal carbohidrato fue la lactosa (86% lactosa, 14% maltodextrinas) pudiendo ser responsable de que la osmolalidad sea ligeramente superior a la observada en la otras fórmulas extensamente hidrolizadas encontradas en el mercado.

Cabe destacar que este tipo de fórmulas destinadas al tratamiento de la APLV, enfermedad en la que no existe intolerancia a la lactosa ni problemas de malabsorción, entidades todas ellas independientes a la APLV, no existe una razón suficiente para eliminar el contenido en lactosa, puesto que la única razón para eliminarla en años anteriores ha sido la prevención de evitar que la lactosa, obtenida a partir de la LV como primera materia prima, arrastrase algún contenido proteico (AEP, 2001). Actualmente no existe ese problema, la lactosa utilizada en estas formulaciones es de calidad farmacéutica (Fiocchi et al., 2003).

Según el SCF (2003), la lactosa es el principal carbohidrato de la leche materna y es fuente de galactosa, necesaria para la formación de galactocerebrósidos; además, la presencia de lactosa puede mejorar la palatabilidad, cualidad importante en este tipo de fórmulas donde, como sabemos, es predominante el

sabor amargo de los hidrolizado proteicos (*Niggemann et al., 2008*). En consecuencia, no existiendo inconveniente desde el punto de vista antigénico y presentándose beneficios desde el punto de vista nutricional y organoléptico, parece razonable la adición de lactosa en las fórmulas destinadas al tratamiento de lactantes con APLV. Además, se han publicado los resultados de un estudio donde un grupo de lactantes con APLV, alimentados con una fórmula extensamente hidrolizada con lactosa frente a la misma fórmula sin lactosa, presentaban una microbiota caracterizada por un predominio de lactobacilos y bifidobacterias sobre clostridios y bacteroides y una mayor contenido de ácidos grasos de cadena corta (*FrancaVilla et al., 2012*).

Por otra parte, el porcentaje en aminoácidos libres, proporción de pesos moleculares inferiores a 200 Da, fue del 3% en nuestra fórmula. Dicho porcentaje es importante por su relación con parámetros como la osmolalidad y la carga renal de solutos de la fórmula. Un elevado contenido en aminoácidos libres no es recomendable, pues hace que estas fórmulas puedan ser hiperosmóticas y puedan provocar secreción intestinal y diarrea; además, se ha comprobado que los dipéptidos y tripéptidos se absorben mejor que los aminoácidos a nivel intestinal (*Daniel, 2004; Boudry et al., 2010*). La mayor parte de los productos de la digestión de las proteínas en lactantes y adultos se absorben en forma de di- y tripéptidos, a través del transportador *PEPT1* situado en la membrana apical de los enterocitos (*Boudry et al., 2010*). El porcentaje de aminoácidos libres en nuestra fórmula fue inferior al encontrado en otra fórmula extensamente hidrolizada de suero que contenía un 20% de aminoácidos libres y un 80% de péptidos pequeños (*Niggemann et al., 2008*).

Identificación de péptidos bioactivos en la fórmula terapéutica

Los péptidos bioactivos son fragmentos proteicos contenidos en las proteínas y cuya actividad funcional (antibacteriana, antioxidante, inmunomodulante, antihipertensiva) no se manifiesta hasta que son liberados de la misma, mediante proteólisis gastrointestinal o tecnológica (química, enzimática, fermentativa, biotecnológica) (*Catalá et al., 2010*). Así pues, la fracción proteica de la leche humana contiene péptidos bioactivos, susceptibles de ser liberados durante la

digestión gastrointestinal (*Hernández-Ledesma et al., 2007; Tsopmo et al., 2011*). La proteína bovina también contiene péptidos bioactivos, identificados a su vez en fórmulas infantiles, diseñadas a partir de estas proteínas lácteas (*Hernández-Ledesma et al., 2007*); estos péptidos también han sido encontrados en proteínas lácteas de origen caprino y ovino.

Las fórmulas infantiles hidrolizadas contienen cientos de péptidos diferentes y a distintas concentraciones (*Catala-Clariana et al., 2010*). En nuestro trabajo se identificaron, tras la digestión *in vitro* de la fórmula terapéutica y su ultrafiltración a través de una membrana de corte de 3000 Da, 14 fragmentos proteicos con potencial actividad inhibidora de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE), 6 de ellos derivados de la β -caseína y 8 derivados de la β -lactoglobulina. También se identificó un péptido (*VLNENL*) que podría tener capacidad inmunomoduladora y antibacteriana, así como otros péptidos con actividad antiviral, antibacteriana, antioxidante. En la fórmula terapéutica en estudio, se identificaron dos péptidos con posible actividad hipertensiva (*LHLPLP* y *LHLPLPL*), que contenían el fragmento (*HLPLP*) derivado de la β -caseína. Estos fragmentos han sido identificados en la leche materna, en una fórmula hidrolizada y en otra fórmula diseñada con leche desnatada y suero proteico (*Hernández-Ledesma et al., 2008*). *LHLPLP* también se ha identificado y se ha mostrado su potencial antihipertensivo en un estudio con ratas (*Quirós et al., 2006 ; Kohmura et al. 1989*).

Tras la digestión *in vitro* de la fórmula terapéutica también se identificaron los fragmentos (*ALPMH* y *ALPMHI*), derivados de la β -lactoglobulina, inhibidores ambos de la ACE (*Mullally et al., 1996; Murakami et al., 2004*). Cabe destacar que en el trabajo realizado por Murakami, se identifican, caracterizan y se aíslan péptidos a partir del hidrolizado de suero proteico (*WE80BG*), utilizado como ingrediente proteico en nuestra fórmula terapéutica. Curiosamente, nuestra fórmula contiene también un hidrolizado de caseína (*CE90STL*), constituido por péptidos con actividad inhibidora de la ACE, como por ejemplo (*LHLPLP, LHLPLPL, SLSQSK...*)(*Kohmura et al., 1989; Yamamoto et al., 1994; Miguel et al., 2006*). Los anteriores investigadores muestran que los hidrolizados (*WE80BG* y *CE90STL*) presentan fuertes efectos antihipertensivos y valores normales de actividad inhibidora de ACE. Curiosamente el fragmento (*ALPMH*) presente en nuestra

fórmula, y caracterizado en otros trabajos por su actividad inhibitoria de ACE, también parece tener cierta actividad hipocolesterolémica al igual que (*IIAEK*) (*Nagaoka et al., 2001*).

Son numerosos los estudios que se han llevado a cabo con el fin de determinar la actividad antihipertensiva de hidrolizados de proteínas lácteas. La actividad antihipertensiva de los péptidos se ha caracterizado *in vivo* en ratas, espontáneamente hipertensas, y mediante la actividad inhibitoria de la enzima convertidora de la angiotensina, ACE. Es necesaria la realización de ensayos en humanos, con el fin de conocer la biodisponibilidad y la bioactividad de estos péptidos pues, la actividad dependerá del sustrato (péptido aislado, péptido contenido en el hidrolizado), del vehículo (producto lácteo, cápsulas, jarabes) e incluso, puede ser dosis dependiente. Se ha mencionado que la obtención de péptidos bioactivos puede producirse a partir de una hidrólisis enzimática de la proteína láctea (*Korhonen y Pihlanto, 2006*), hecho que nosotros corroboramos en nuestra fórmula terapéutica.

Cabe pensar que algunos de estos péptidos identificados en nuestra fórmula, de acuerdo a la actividad que se les otorga al comparar en bibliotecas de péptidos bioactivos, puedan ser aislados y utilizados como ingredientes funcionales o suplementos dietéticos funcionales, pues existe un interés comercial creciente en la producción de péptidos bioactivos. De hecho, existe una patente internacional de péptidos bioactivos, identificados en hidrolizados enzimáticos de caseínas lácteas, y su procedimiento de obtención, WO2006131586, además de otras patentes de péptidos bioactivos derivados de diversas fuentes proteicas. No obstante, la actividad inhibitoria de ACE en las fórmulas infantiles hidrolizadas se ha demostrado en varios estudios *in vitro* e *in vivo* en animales (*Hernández-Ledesma et al., 2007; Martín et al., 2008; Catalá et al., 2010*), pero no existen estudios que demuestren la disminución de la presión sanguínea en recién nacidos. En estudios realizados *in vitro*, se observa que las fórmulas hidrolizadas poseen mayor potencial inhibitorio que las fórmulas convencionales, e incluso que las muestras de leche materna, antes y después de ser sometidas a la digestión *in vitro*; además identifican en las fórmulas hidrolizadas, por primera vez, un di-péptido Ile-Trp con un enorme poder inhibitorio de ACE (*Martín et al., 2008*).

Otra funcionalidad que se les otorga a algunos péptidos bioactivos es la capacidad antioxidante. Generalmente esta capacidad antioxidante se mide mediante el ensayo ORAC, capacidad de absorción de radicales de oxígeno libres, o incluso ensayos de oxidación del ácido linoléico. Esta capacidad es importante desde el punto de vista tecnológico, pues estos péptidos antioxidantes pueden ser empleados como ingrediente o aditivo conservador o protector de la oxidación lipídica de algunos componentes alimenticios. A su vez, se especula con el hecho de que puedan ejercer un papel antioxidante a nivel celular en el organismo y puedan ser utilizados en la prevención de enfermedades degenerativas como el cáncer o Alzheimer, donde se producen procesos oxidativos importantes. Concretamente, otros investigadores identificaron en muestras de leche materna, péptidos con elevada actividad antioxidante, pudiendo ser éstos candidatos en la suplementación de fórmulas infantiles, con el fin de reducir la incidencia de enfermedades mediadas con estrés oxidativo, en recién nacidos prematuros (enterocolitis, retinopatía, fallo renal, disfagia broncopulmonar) (Tsopmo et al., 2011).

En nuestro trabajo, se identificaron algunos fragmentos (*SLAM* y *SLAMA*) derivados de la β -lactoglobulina, contenidos en el fragmento (*WYSLAMA*), al cual se le atribuye actividad antioxidante (Hernández-Ledesma et al., 2007). También se identificaron fragmentos con actividad antibacteriana, tales como: (*ISQPE*), derivado de la lactoferrina, fragmento del péptido (*APRKNVRWCTISQPEW*) con actividad antibacteriana (Recio y Visser, 1999) y el fragmento (*IPAVF*) contenido en el fragmento (*IPAVFK*) con actividad antibacteriana (Pellegrini et al., 2001).

Cabe la posibilidad de que existan péptidos lácteos inmunomoduladores capaces de aliviar reacciones alérgicas y de aumentar la inmunidad del tracto gastrointestinal, pudiendo regular el desarrollo del sistema inmunitario del recién nacido (Korhonen et al., 2006). De hecho, en nuestra fórmula terapéutica se identificó, tras la digestión *in vitro*, el fragmento (*VLNENL*), que se identifica a su vez en el fragmento (*RPKHPIKHQEVLNENLLRP*); este último posee actividad antibacteriana e inmunomoduladora (Lahov y Regelson, 1996; Hayes et al., 2007).

Los análisis de péptidos bioactivos en nuestra fórmula terapéutica nos permitieron identificar numerosos fragmentos en la fórmula derivados de los hidrolizados de caseína y suero (CE90STL y WE80BG) utilizados en la formulación. Se podría pensar que estos péptidos puedan ser absorbidos a nivel intestinal por el lactante con APLV y que ejerzan algún papel funcional beneficioso. Para hacer tal afirmación primero tendríamos que demostrar, *in vitro* e *in vivo* en animales, la capacidad antioxidante, antibacteriana, inhibidora de ACE, antihipertensiva, opiácea, antitrómbica, inmunomoduladora, entre otras, de nuestra fórmula terapéutica. Desde un punto de vista inmunológico cabría la posibilidad de trabajar en la identificación en nuestra fórmula hipoalérgica de péptidos con actividad inmunomoduladora relacionada con la APLV (caracterización, aislamiento y escalado industrial); de esta manera, tendríamos péptidos bioactivos, disponibles para ser ofrecidos como ingrediente o alimento funcional disponible para la industria farmacéutica, aplicada a la prevención o tratamiento de la APLV. Obviamente, en todo caso se trata de una perspectiva futura de investigación.

Desde el punto de vista del investigador, y de acuerdo a la creciente incidencia y prevalencia de alergias, podría ser interesante afrontar este tipo de retos pues, como hemos visto a lo largo de revisión bibliográfica, las alergias son enfermedades multifactoriales y desde el punto de vista nutricional e inmunológico son múltiples los compuestos funcionales (AGPI-CL ω -3, péptidos bioactivos, vitamina D, etc...), que pueden actuar y conducir la respuesta inmunológica.

Caracterización antigénica y nutricional de los hidrolizados in vivo

Los resultados de los ensayos analíticos realizados en el laboratorio no pueden, por sí solos, garantizar la hipoalergenicidad ni el valor nutricional, en este tipo de fórmulas por lo que es necesario realizar ensayos con animales antes de su utilización en lactantes diagnosticados. Además, los resultados obtenidos en los modelos animales siguen sin ser extrapolables al comportamiento en humanos; concretamente, en la APLV seguimos sin conocer un umbral de reacción, ya que este dependerá de cada individuo, pues hay casos en los que los lactantes son alérgicos incluso a las fórmulas extensamente hidrolizadas (*Antunes et al., 2009*).

Por razones de seguridad y de acuerdo a las guías de la comisión europea, es necesario comprobar la capacidad de sensibilización de las fórmulas en modelos animales (*ESPGAN, 1993; SCF 1993; SCF 2003, Directiva 2006/141/CE*) y comprobar el valor biológico de las proteínas mediante ensayos con animales (*SCF 1993, SCF 2003, Directiva 2006/141/CE*).

Caracterización in vivo– Prueba de anafilaxia sistémica con los hidrolizados

La sensibilización de las proteínas alimentarias ha sido estudiada generalmente en modelos murinos, concretamente en cobayas (*Boza et al., 1995, Boner et al., 1992; Piacentini et al., 2003*), aunque también algunos investigadores han utilizado ratas (*Fristché y Bonzon, 1990; Lara-Villoslada et al., 2005*) e incluso ratas libres de gérmenes (*Xiu-Min et al., 1999; van Esch et al., 2011*). Sin embargo, las cobayas constituyen un modelo adecuado, con la ventaja de ser sensibilizadas vía oral sin coadyuvantes, de manera que se asemejaría a la manera de sensibilización humana y con la desventaja de que las cobayas, al igual que las ratas, desarrollan anticuerpos IgG1a específica y no IgE (*Fritsché, 2003; Bailón et al., 2012; van Esch et al., 2013*), mientras que los modelos con ratas suelen emplear coadyuvantes (toxina cólera) y la sensibilización suele ser vía parenteral o a través de sonda gástrica (*Von der weid et al., 2001; Lara-Villoslada et al., 2005; Bailón et al., 2012*), siendo estos los principales inconvenientes encontrados en los ensayos con ratas. Según algunos autores, el inconveniente de utilizar modelos murinos es que la sensibilización oral es complicada y los animales podrían desarrollar de manera innata una tolerancia oral hacia la proteína ingerida (*Fristché, 2003*). El principal inconveniente de la utilización de coadyuvantes es que, aunque parecen necesarios para evitar el potencial tolerogénico hacia el antígeno estudiado, también pueden provocar una respuesta hacia otros antígenos alimentarios distintos al antígeno de interés, pérdida de especificidad y podrían provocar una respuesta inmunológica hacia el propio coadyuvante con el tiempo (*Bailón et al., 2012*); otro inconveniente de los ensayos con ratas es el largo periodo de sensibilización, de 6 a 8 semanas (*Li et al., 1999; Bailón et al., 2012*).

Recientemente se han publicado los resultados de la validación de un modelo murino en el que los animales se sensibilizan oralmente durante un periodo de 14

días, evitando de esta manera la posible respuesta debida al coadyuvante, y a los 18 días realizaban la provocación intraperitoneal (*Bailón et al., 2012*). En este trabajo el tiempo necesario para la sensibilización es aproximadamente igual al que nosotros necesitamos con las cobayas y con estas tuvimos la ventaja de sensibilizar a los animales oralmente sin necesidad de coadyuvantes. También se ha publicado los resultados de la validación de un nuevo modelo murino, realizada en 4 centros distintos de investigación. Este nuevo modelo murino sensibiliza mediante sonda gástrica y sensibilización oral y combina la determinación de anticuerpos IgE, IgG₁ y mMCP-1 en suero junto con la sintomatología (shock anafiláctico, caída de la temperatura corporal, reacción alérgica en la piel) con el fin de evitar falsos positivos o negativos (*van Esch et al., 2013*)

En nuestro trabajo las cobayas destetadas que ingerían suero lácteo durante 15 días, una vez transcurrido el periodo de lavado de siete días y sometidas a la prueba de anafilaxia, morían, mientras que al grupo de animales sensibilizados con la proteína intacta y provocados con el hidrolizado extenso de suero (WE80BG) no les sucedía nada (*Matencio et al., 2010*). De esta manera, en nuestro trabajo, sin necesidad de analizar anticuerpos específicos en los animales se manifestó, la sensibilización oral de los animales a través de la aparición inmediata de síntomas, así como la tolerancia de los hidrolizados estudiados por ausencia de los mismos (*Matencio et al., 2010*). Con anterioridad a nuestro trabajo, otro grupo de investigación utiliza cobayas en la determinación de la alergenicidad de un hidrolizado extenso de suero; nuestros resultados coincidieron con los resultados observados en este trabajo (*Boza et al., 1995*). Parece relevante mencionar que la aparición de síntomas en el caso del modelo con cobayas es inmediata (*Matencio et al., 2010; Boza et al., 1995*), mientras que en el caso de los modelos con ratones tras la provocación vía intraperitoneal, se evidencian los síntomas transcurridos unos 15 a 30 minutos (*Villoslada et al., 2005; Bailón et al., 2012*). Las cobayas son más sensibles a las proteínas lácteas que las ratas, aunque los estudios son más costosos (*Li et al., 1999*).

Durante la prueba de anafilaxia sistémica nosotros observamos que, mientras las cobayas sensibilizadas con las proteínas séricas sufrían un choque anafiláctico y muerte inmediata, las cobayas sensibilizadas con caseínas presentaban síntomas

secundarios (pelo erizado, enrojecimiento del pabellón auditivo, dificultad en la respiración) y transcurrido cierto tiempo se recuperaban (*Matencio et al., 2010*). Este hecho pone de manifiesto que la alergenicidad de las proteínas séricas es superior. Nuestros resultados no coinciden con las conclusiones del trabajo de Villoslada et al., en el que se observa que una sensibilización mayor de los animales, cuando se les administra proteína de leche de vaca que en el caso de la administración de las fórmulas con proporción caseína:suero 40:60 (*Villoslada et al., 2005*).

Cabe mencionar que, aun estableciendo la reducida alergenicidad de los hidrolizados terapéuticos a través de composición molecular de los mismos y la ausencia de sensibilización a través de modelos murinos, nunca se podrá afirmar que un hidrolizado terapéutico sea totalmente seguro para el tratamiento de niños con APLV sin haber realizado previamente un ensayo clínico con lactantes diagnosticado (*Fiocchi et al., 2010; AAP 2000; Host et al., 1999*); y aun así, continuaría sin existir el riesgo cero (*Madsen et al., 2012*). Sin embargo, este tipo de ensayos preliminares son necesarios antes de seleccionar un hidrolizado para el tratamiento de lactantes con APLV; son herramientas útiles de *screening* (*Cordle et al., 2011*).

Caracterización in vivo– Valor biológico de los hidrolizados

De acuerdo con las guías, además de la seguridad y tolerancia de las fórmulas, se evidencia la necesidad de asegurar la capacidad nutricional de las mismas pues, en algunos casos, se han encontrado lactantes alérgicos con fallo de medro o malnutrición (*Host et al., 1999, Fiocchi et al., 2010, Meyer et al., 2012*). Así pues, el comité científico de la Unión Europea considera necesario comprobar el valor biológico de las proteínas mediante ensayos con animales (*SCF 1993, SCF 2003, Directiva 2006/141/CE*). Las principales críticas a estos métodos se basan en los diferentes requerimientos en aminoácidos de la rata y del hombre (*SCF 2003*). Un valor de 2.5 para el coeficiente de eficacia en crecimiento (PER), es el mínimo necesario considerado para las fórmulas lácteas para nutrición infantil por la ESPGHAN y, de igual forma, un valor biológico (VB), de al menos el 70% (*Acta Paediatric, 1977*).

Así pues, cabe destacar que, tanto el hidrolizado de caseína (CE90STL) como el de suero (WE80BG), usados para la formulación de la fórmula terapéutica hipoalergénica, cumplían estos requerimientos establecidos (PER: 3.69, 3.62 vs 4.14 $p=0.001$) (BV: 75, 73 vs 86 % $p<0.001$) (*Matencio et al., 2011*); sin embargo, los valores de CDV y la NPU en los hidrolizados eran inferiores respecto al grupo de la caseína (CDV: 92, 92 vs 94 % $p<0.001$; NPU: 70, 68 vs 81, $p<0.001$), pudiendo pensar que la hidrólisis ejerce un efecto negativo, probablemente debido a la competencia por los transportadores intestinales entre los aminoácidos libres (*Boudry et al., 2010*).

De hecho, otros investigadores han demostrado que un grupo de ratones, alimentados con hidrolizado extenso, ganan más peso que los ratones alimentados con la dieta elemental; esta ganancia de peso está relacionada con una retención de nitrógeno estadísticamente superior (*Boza et al., 2000*). En la década de los noventa, este mismo grupo, ha realizado ensayos con ratas para conocer el valor nutricional de ciertos hidrolizados que, posteriormente, se han podido emplear en fórmulas infantiles hipoalergénicas. De igual manera que en nuestro trabajo, este grupo de investigación observa que no existen diferencias significativas en la ingesta proteica y en la ganancia de peso, entre los animales alimentados con los hidrolizados proteicos y la proteína intacta (*Boza et al., 1994; Boza et al., 1995*). Sin embargo, ellos no observan diferencias significativas en el CDV, a diferencia de nuestro estudio que mostró valores inferiores al grupo de referencia (*Matencio et al., 2010*). Al igual que en nuestro trabajo este grupo observa, en el grupo alimentado con el hidrolizado de caseína, un VB y NPU inferiores a los obtenidos con la caseína de referencia (BV: 79.8 vs 85.6 %; NPU: 78.2 vs 82 %) (*Boza et al., 1994*).

Ensayo clínico con lactantes con APLV

En nuestro trabajo, una vez diseñada y validada la fórmula hipoalergénica mediante los ensayos *in vitro* e *in vivo* con animales, se procedió a la realización de un ensayo clínico con lactantes diagnosticados, requisito establecido en las guías publicadas por AAP, ESPGHAN, WAO; actualmente solo unas pocas fórmulas

extensamente hidrolizadas comercializadas, han mostrado su validación mediante este tipo de ensayos (*Koletzko et al., 2012; Muraro et al., 2012; Dupont et al., 2012*).

Los objetivos principales de nuestro ensayo fueron evaluar la seguridad, tolerancia y capacidad nutricional de la nueva fórmula terapéutica. Para ello se estableció la necesidad de realizar un seguimiento de 3 meses en los lactantes diagnosticados, aunque se observó un abandono del estudio de un 27% (8 de 30). Al igual que en el estudio realizado con un fórmula comercial extensamente hidrolizada de suero (*Niggemann et al., 2008*), el principal motivo para la retirada del estudio fue el abandono del seguimiento por los padres. En nuestro caso, es muy probable que el abandono no se debiese a razones de rechazo o intolerancia de la fórmula; la situación más habitual cuando aparecen problemas relacionados con la ingesta de la fórmula es que los padres se comuniquen inmediatamente con los investigadores responsables del estudio, quienes deciden la continuación o retirada del estudio. Si comparamos con otros ensayos recientes, también existe un abandono importante por sensibilización en el grupo alimentado con soja; en los grupos alimentados con hidrolizados de caseína y arroz, el abandono se produce por no aceptación de la fórmula y/o ligeras complicaciones relacionadas con el consumo de éstas (*Agostoni et al., 2007*).

Características sociodemográficas y clínicas antes del reclutamiento

La edad media de los lactantes al iniciar el estudio correspondía a 4.3 ± 1.3 meses (mínimo 40 - máximo 210 días), intervalo de edad observado en la mayoría de estudios observacionales y clínicos publicados (*García et al., 2001; Agostoni et al., 2007; Niggemann et al., 2008, Reche et al., 2010*); este intervalo coincide con la edad a la cual es habitual en España el cambio de la lactancia materna a lactancia artificial (*García et al., 2001; Gomis et al., 2009*). Antes de comenzar el estudio, el 79.2% de los lactantes habían recibido lactancia materna exclusiva en algún momento desde su nacimiento y solamente el 37.5% no recibieron ningún tipo de lactancia artificial. Además, la duración de la lactancia materna exclusiva antes del reclutamiento había sido de 129.7 ± 26.7 días, con lactancia mixta 6.8 ± 8.2 días y con lactancia artificial exclusiva 13 ± 21.4 días. Como podemos observar, el

porcentaje de lactancia exclusiva o mixta fue elevado, poniéndose de manifiesto la falta de suficiente evidencia científica para afirmar que la lactancia materna tenga efecto protector sobre la aparición de las alergias, de acuerdo con lo expuesto en recientes meta-análisis (*Sección de lactancia materna, AEP 2012, ESPGHAN 2009*). La duración de lactancia materna exclusiva puede ser un factor relevante pues, en nuestro estudio, la mayoría de sujetos reclutados eran menores de seis meses de edad y ninguno de ellos había sido lactado exclusivamente con leche materna durante los 6 primeros meses. Como referencias, podemos mencionar que, en la región de Murcia, la prevalencia de lactancia materna hasta los 5 a 7 meses de edad es de un 5.5% (*Gomis et al., 2009*) y la duración de lactancia materna exclusiva en España, de acuerdo a los resultados del estudio IDEFICS, es de aproximadamente 3.2 meses (*Hunsberger et al., 2012*). Además, sabemos que los síntomas alérgicos pueden aparecer incluso en el período de lactancia materna exclusiva, aunque lo más frecuente es que empiecen al iniciar la lactancia artificial (*Plaza, 2003*).

En nuestro estudio, la edad gestacional media era de $38,8 \pm 1,7$ semanas y el peso medio al nacer era de $3,3 \pm 0,5$. No se recogieron datos del tipo de parto vaginal o cesárea, pudiendo ser este dato relevante pues algunos estudios han encontrado cierta relación entre el nacimiento por cesárea y el desarrollo de alergias; aunque sí sabemos, por el estudio EuroPrevall que en España un porcentaje inferior al 3% de los nacimientos son por cesárea (*McBride et al., 2012*). En nuestro estudio un 62.5% eran niños y un 37.5% niñas, un 20.8% convivían con fumadores activos y un 50% no tenían antecedentes de primer grado, mientras que un 20.8% tenían antecedentes de rinitis alérgica en la familia; este último porcentaje coincide con los datos del ensayo EuroPrevall. En España, cerca del 20% de los padres presentan rinitis alérgicas (*McBride et al., 2012*). La recogida en la historia clínica de estos datos es relevante, pues se sabe que tanto los antecedentes familiares como factores medioambientales influyen en el desarrollo de la alergia (*Cochrane et al., 2009; Prescott y Nowak-Wegrzyn, 2011*).

La exposición al tabaco, así como otros factores medioambientales, deben ser evitados en medida de lo posible y así es aconsejado por alergólogos, pediatras y en las guías actuales del manejo y prevención de alergias (*Dalmau et al., 2008*;

Tormo y Martín 2010; Wahn 2008; Greer et al., 2008); el humo de tabaco puede acentuar los síntomas respiratorios y fomentar la sensibilización hacia aeroalergenos y alérgenos alimentarios incluso en lactantes de padres no alérgicos (*Lannerö et al., 2008; Prescott 2008*).

En el estudio EuroPrevall se registra que el 17% de los niños españoles y griegos han estado expuestos al humo de tabaco durante el embarazo frente al 10% del resto de países europeos (*McBride et al., 2012*). España es uno de los países con mayor tasa de exposición al humo de tabaco durante el embarazo (*Hunberger et al., 2012*). El grado de evidencia sobre el humo de tabaco como factor de riesgo para el desarrollo de alergias alimentarias y enfermedades atópicas es alto (*Prescott y Nowak-Wegrzyn, 2011*). Por otra parte, el 50% de nuestra población de estudio carecía de antecedentes de primer grado, luego cabe pensar que, aun sabiendo la importancia de la influencia de la carga familiar en el desarrollo de alergias, los factores medioambientales parecen tener bastante relevancia.

En el momento del diagnóstico la edad media era de 4.1 ± 1.2 meses y transcurrieron 1.6 ± 6.7 días entre el diagnóstico y el inicio del estudio. Respecto a la introducción de la alimentación complementaria antes del comienzo del estudio, el 33.3% de los lactantes con APLV no habían iniciado alimentación complementaria, un 47.6% habían tomado cereales sin gluten, un 4.8% cereales con gluten, un 23.8% compota de frutas, un 28.6% puré de verduras, un 19% pollo y un 4.8% otras carnes magras. Como era de esperar, la introducción de la alimentación complementaria antes del inicio del ensayo coincide con las recomendaciones del comité de nutrición de la AEP, en relación con la introducción entre los 4 a 6 meses de edad en los casos de lactancia mixta o artificial (*Gil et al., 2006*). Además, el consumo de cereales sin gluten predomina, observándose la introducción gradual de otros alimentos sólidos, como purés de frutas, vegetales y carnes.

Antes de la inclusión en nuestro estudio los síntomas más frecuentes fueron: erupción cutánea (95.8%), prurito (41.7%). El 62.5% de los lactantes presentaron más de un síntoma. Nuestros datos clínicos se asemejan a los de otros estudios: En un estudio el 100% de los sujetos experimentaron urticaria o angioedema tras la

ingesta de LV, junto con vómitos en el 12% de los casos y diarrea aguda en el 3% (*Martín et al., 1998*). Datos obtenidos en otro estudio muestran que el 78% de los lactantes presentan dermatitis atópica (*Niggemann et al., 2008*) y en otro estudio un 78.6% presentan eczema atópico, un 23.1% urticaria o angioedema, un 11.9% asma o rinitis, 8.6% síntomas gastrointestinales y un 5.4% anafilaxia (*Agostoni et al., 2007*). De acuerdo con estos ensayos podemos concluir que el síntoma más frecuente de la APLV mediada por IgE, a estas edades, se asocia a una manifestación cutánea inmediata.

Para la inclusión en el estudio y en general en las consultas de alergia, un diagnóstico correcto de la enfermedad se demuestra fundamental. En un estudio sobre la incidencia de la APLV durante el primer año de edad aparece una alta tasa de casos con sospecha de APLV que, al ser sometidos al protocolo de diagnóstico, son descartados. En este estudio, de los 333 lactantes que acuden a la consulta de alergia infantil se diagnostican como alérgicos a 179, un 54% (*García et al., 2001*). Este hecho pone de manifiesto que un alto porcentaje de los lactantes que acuden a las consultas de atención primaria en pediatría, con sospechas de APLV, son diagnosticados erróneamente, en base a la valoración subjetiva aportada por los padres y al examen físico realizado por el pediatra. El resultado es que a la mayoría se les recomienda el uso de hidrolizados sin ser estrictamente necesarios; sólo una minoría de los casos es remitida a la consulta de alergias.

En nuestro estudio, el diagnóstico de la enfermedad antes de la inclusión se caracterizó porque en el 100% de los casos se utilizó tanto la historia clínica, como las pruebas cutáneas y determinación de IgE en suero. La determinación de IgE específica sérica en el diagnóstico de la APLV inmediata, con valores superiores a 2.5 KUA/l, tienen un valor predictivo del 90%, pudiendo obviarse la prueba de provocación con leche en estos casos (*Plaza, 2003*). En nuestro estudio la prueba de provocación con LV se realizó en el 73% de los lactantes, es decir, en aquellos en los que dicha prueba no suponía poner en riesgo al lactante diagnosticado de acuerdo a las recomendaciones (*García et al., 2001; Plaza 2003*) pues, como se notifica en la guía DRACMA (*Fiocchi et al., 2010*) y en la última guía de diagnóstico publicada por *ESPGHAN* (*Koletzko et al., 2012*), existen circunstancias para las cuales la prueba de provocación puede ser omitida. Estas circunstancias se refieren

a la probabilidad de APLV extremadamente alta y de presentarse un proceso demasiado arriesgado, como ocurre en el caso de niños sensibilizados con historial de anafilaxia o edema de glotis; Sin embargo, la APLV no puede ser descartada cuando el test de prick y los niveles de IgE específica son negativos y existen síntomas gastrointestinales; en estos casos es necesaria la prueba de provocación, pues podríamos encontrarnos con un caso de APLV no mediada por IgE. Aun así, niveles positivos de IgE específica en suero parecen predecir un periodo largo de intolerancia, comparado con aquellos niños que no presentan niveles elevados de IgE (*Host et al., 2002*).

En nuestro estudio, los resultados de las pruebas cutáneas realizadas para el diagnóstico de APLV mostraron sensibilización en el 79.2% para LV, 87.5% para β -lactoglobulina, 83.3% en α -lactalbúmina y en el 70.8% para caseína. Los resultados encontrados coinciden con lo expuesto en la guía DRACMA, donde se pone de manifiesto que el 80% y 76% de los sujetos con APLV reaccionan a la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina (*Fiocchi et al., 2010*). Las pruebas de IgE específica frente a la proteína de la LV y sus fracciones se realizan para encontrar características diferenciales en los pacientes. Un estudio realizado en España ha encontrado que el aumento de IgE específica a la caseína se relaciona con una mayor dificultad para alcanzar la tolerancia (*Plaza, 2003*). Nuestros resultados mostraron sensibilización a la LV en el 71% de los lactantes, siendo la β -lactoglobulina y α -lactoalbúmina sensibilizante en 63% de los casos y en el 45% la caseína.

Los protocolos de diagnóstico en pediatría recomiendan efectuar pruebas cutáneas con los alimentos más sensibilizantes en la infancia, pues un gran porcentaje de niños con APLV suelen presentar sensibilización a otros alimentos (*Plaza, 2003*). Los resultados de este trabajo mostraron que más del 50% de los sujetos estaban sensibilizados al pescado (bacalao) y al huevo, según los resultados del test de prick. En nuestro caso, se recomendó retrasar la introducción de los alimentos más alergénicos, como huevo y pescado, a todos los lactantes reclutados, de acuerdo a las recomendaciones de la AEP de 2001. Sin embargo, las últimas recomendaciones de la AEP, AAP y ESPGHAN sostienen que retrasar la introducción de estos alimentos no tiene ningún efecto beneficioso en la prevención y debería evitarse, a

menos que existan pruebas de que los lactantes son alérgicos a estos alimentos (*Dalmau et al., 2008; Greer et al., 2008; Agostoni et al., 2008; Koletzko et al., 2012*).

Por tanto, parece importante conocer el porcentaje de niños con APLV que a su vez podrían experimentar cualquier otro episodio de alergia hacia otros alimentos, tanto para prevenir el desenlace de la enfermedad en aquellos que son realmente alérgicos como para evitar la retirada de alimentos de la dieta del lactante con APLV, que potencialmente no van a provocar una respuesta alérgica, pues no se encuentra sensibilizado hacia esa proteína.

Valoración de la seguridad y tolerancia de la fórmula terapéutica

En nuestro estudio, de los 44 lactantes con APLV seleccionados, tras la prueba de provocación con el hidrolizado solamente un lactante experimentó una reacción alérgica a la fórmula hidrolizada (2.3%), poniéndose de manifiesto que dicha fórmula podría ser alergénica en sujetos muy sensibles. Esta situación se observa en la mayoría de ensayos realizados con fórmulas extensamente hidrolizadas. En un estudio realizado en lactantes con APLV, provocados con un hidrolizado de suero, 2 de 26 (8%) resultan sensibles y con otro hidrolizado de suero, 1 de 31 (3%) presenta síntomas (*Giampietro et al., 2001*); en otro estudio con una fórmula de composición similar a la de nuestro estudio (hidrolizado de caseína:suero 40:60), 1 de 22 (4.5%) presenta síntomas (*Martín et al., 1998*). Podemos observar que las fórmulas extensamente hidrolizadas presentan cierta alergenicidad. Las fórmulas elementales, consideradas hasta hoy adecuadas para el tratamiento de las alergias múltiples y de los casos sensibles a los hidrolizados extensos, pueden resultar reactivas en determinados casos. Este hecho ha sido descrito en estudios recientes, donde se ha observado la aparición de efectos adversos retardados (*Caffarelli et al., 2002; Nilsson et al., 1999*).

La prueba de provocación realizada en nuestro estudio fue un ensayo abierto y no un ensayo doble ciego, placebo-control, DBPCFC. Aun siendo esta prueba el estándar de oro en el diagnóstico, el *SCF* (1993) y *ESPGHAN* (1999) consideran que un ensayo abierto, con suficiente número de sujetos, es más apropiado, ya que se

evita la posible aparición de reacciones agudas en sujetos altamente sensibilizados. Además, el ensayo DBPCFC, es un ensayo que consume bastante tiempo y dinero. De hecho, este ensayo debe evitarse cuando en las pruebas de provocación se reflejan síntomas objetivos (vómitos, urticaria, obstrucción bronquial, etc.) que correlacionan con el historial médico y con los niveles de IgE específica en plasma (Koletzko et al., 2012).

De acuerdo con los resultados derivados de la prueba de provocación, el 97.7% de los lactantes alérgicos (43 de 44) toleran la nueva fórmula. Nuestros resultados son semejantes a los resultados de un trabajo publicado con anterioridad, donde se demuestra que una fórmula extensamente hidrolizada caseína:suero 40:60 es tolerada por el 94% de los sujetos (31 de 33) (Martín et al., 1998). A su vez, otro ensayo más reciente evalúa la seguridad, mediante un ensayo DBPCFC, de una fórmula extensamente hidrolizada con lactosa frente a una fórmula elemental, en 66 lactantes con APLV mediada por IgE. La fórmula es tolerada por más del 90 % de los lactantes, mostrando un intervalo de confianza del 95%, pues en ninguno de los lactantes diagnosticados aparecen síntomas alérgicos durante el ensayo de provocación (Niggemann et al., 2008).

La seguridad de la fórmula se confirmó mediante el ensayo de provocación con la fórmula terapéutica en estudio. Con estos resultados, quedó establecida la seguridad y tolerancia de la fórmula, ya que fué tolerada por más del 90% de los lactantes con APLV (SCF 1993; Committee on Nutrition AAP, 2000; Host et al., 1999; Vandenplas et al., 2007; Fiocchi et al., 2010; Koletzko et al., 2012).

Posteriormente, se continuó con el seguimiento de 3 meses de duración, evaluando durante este periodo de tiempo la tolerancia de la fórmula, en base a la aparición de nuevos episodios de reagudización, y el estado nutricional del lactante, mediante las medidas antropométricas. Con respecto a la manera de proceder en nuestro ensayo cabe mencionar que la valoración de la seguridad y tolerancia de una fórmula extensamente hidrolizada (Martín et al., 1998; Ibero et al., 2010) se basa en las pruebas de diagnóstico (prick, IgE en suero y prueba de provocación abierta). Sin embargo, en otro estudio se realiza un primer ensayo de seguridad basado en las pruebas de diagnóstico y posteriormente un ensayo clínico abierto,

con registro de síntomas relacionados con la alergia, tolerancia de la fórmula, crecimiento, volumen ingerido y estatus metabólico. Posteriormente, se comparan los resultados del grupo de intervención (n=33) frente a un grupo control (n=32), al que le fue suministrado una fórmula elemental (*Niggemann et al., 2008*). Con anterioridad, otros investigadores también han evaluado la seguridad de una fórmula extensamente hidrolizada de suero, mediante un ensayo abierto de provocación (*Halken et al., 1993*).

En el primer mes de intervención de nuestro ensayo, 1 de 30 pacientes (3.3%) presentó episodios de reagudización de APLV según el criterio clínico establecido en el protocolo, no apareciendo síntomas a los 2 y 3 meses de seguimiento. Basándonos en estos resultados se concluye que el 96.7% de los pacientes toleran la fórmula. En otro ensayo, cuyo principal objetivo es la valoración nutricional de los lactantes alimentados con distintos hidrolizados, aquellos lactantes que desarrollan reagudización de los síntomas durante el primer mes de tratamiento son retirados del estudio: 5 de 37 del grupo alimentado con una fórmula de soja, 6 de 36 del grupo alimentado con un hidrolizado de arroz y 4 de 36 del grupo alimentado con un hidrolizado de caseína (*Agostoni et al., 2007*). Nuevamente se pone de manifiesto que todas las fórmulas hipoalergénicas presentan cierta alergenicidad para individuos muy sensibilizados.

Concretamente, durante el periodo de 3 meses de seguimiento un lactante experimentó una erupción cutánea y otro lactante experimentó vómitos y dolor abdominal durante el primer mes, siendo ambos retirados del ensayo. Se observó una asociación temporal entre la aparición de los síntomas y el consumo de la fórmula, pero la causa es probablemente de otra etiología. La valoración del pediatra se basó en el examen físico y la información reportada por los padres y recogida en el CRD, debiéndose considerar en estos casos, la susceptibilidad y subjetividad de los padres. Al igual que en nuestro ensayo, en el ensayo de *Niggemann et al. (2008)* se observan efectos adversos gastrointestinales, respiratorios y cutáneos y ninguno de ellos es relacionado con el consumo de la fórmula hidrolizada ni clasificados como severos según el criterio del investigador. Teniendo en cuenta los datos recogidos en los CRD sobre los efectos adversos, los síntomas más frecuentes fueron los síntomas gastrointestinales (vómitos y

diarrea); sin embargo, ninguno de los síntomas fue valorado como síntoma severo por los investigadores, sin olvidar tampoco que el porcentaje de transgresión del tratamiento fue elevado y la subjetividad de los padres afectó directamente la objetividad de los resultados.

Otro aspecto importante relacionado con la tolerancia de la fórmula y su seguridad es el estudio del aspecto, color y consistencia de las heces. En nuestro estudio solo disponíamos de los datos recogidos en el cuaderno de recogida de datos del lactante, pues todos los sujetos reclutados sufrían APLV mediada por IgE, no siendo en ese caso necesarios como prueba diagnóstica los parámetros medidos en heces, según protocolo establecido. En cuanto a las características de las heces, el 23.3% de los lactantes presentaban heces con consistencia normal durante el estudio, el 18.6% color normal, el 90.7% sin sustancias extrañas y el 93% con un aspecto normal. De nuevo estos datos no presentan significancia médica, aunque sí parece relevante destacar la ausencia de sustancias extrañas y que a los 3 meses de tratamiento la consistencia predominante de las heces fueron heces pastosas, seguidas de heces normales y desaparecieron las heces líquidas.

Al igual que en nuestro trabajo, otros autores también registran las características de las heces, observándose en algunos casos la anotación de heces negras; esto podría indicar sangrado intestinal, aunque no es confirmado por los investigadores, no considerándose de relevancia médica (*Niggemann et al., 2008*). En nuestro estudio, como en el estudio anterior, los sujetos reclutados son lactantes con APLV mediada por IgE en los que no es usual encontrar sangre en las heces, siendo este último síntoma más frecuente en los lactantes con APLV no mediada por IgE.

Valoración nutricional de la fórmula terapéutica

Los lactantes con APLV tienden a presentar un crecimiento más lento que los lactantes sanos (*Isolauri et al., 1998; Agostoni et al., 2007; Menella et al., 2011*), estando este efecto relacionado con múltiples factores:

- La dieta de eliminación y bajas ingestas de la fórmula como consecuencia de su característico sabor amargo (*Vandenplas et al., 1993; Dalmau et al., 2008*),

- Una menor absorción de nutrientes a nivel intestinal a consecuencia de una respuesta inflamatoria intestinal (*Isolauri et al., 1998; Seppo et al., 2005*),
- La presencia de otros síntomas alérgicos a otros alimentos, que constituyen también un riesgo nutricional asociado (*Moreno et al., 2006*).

De acuerdo con estas observaciones es necesario que los fabricantes de fórmulas infantiles hipoalergénicas, destinadas a la alimentación de niños con APLV, se esfuercen en diseñar fórmulas que organoléptica y nutricionalmente sean aceptadas y adecuadas para asegurar un correcto crecimiento y desarrollo.

En nuestro trabajo, además de asegurar la baja alergenicidad de la fórmula mediante la selección de ingredientes que cumpliesen los criterios establecidos para tal caso (*Acta Paediatrica 1993*), se tuvo en cuenta la utilización de ingredientes como la lactosa y una proporción caseína:suero 20:80. El objetivo fue la mejora de la palatabilidad de la misma, pues existe un porcentaje importante de rechazo entre las fórmulas extensamente hidrolizadas debido a su sabor amargo (*Pedrosa et al., 2006*). En nuestro trabajo, la valoración nutricional se basó en las medidas antropométricas y los parámetros bioquímicos en sangre.

Valoración nutricional resultante de las medidas antropométricas

Curiosamente, en nuestro estudio en el caso de las niñas, los valores de puntuación Z para peso, se situaron 0.2 desviaciones por encima de la mediana o percentil 50 y en el caso de los niños entre 0.4 a 0.6 desviaciones por encima. En ambos casos se encontraron próximos al percentil 50, no existiendo en ningún caso ni malnutrición (situada por debajo del percentil 10) ni riesgo de obesidad (por encima del percentil 97); si comparamos nuestros resultados con el estudio de Agostoni, en éste la puntuación Z para el peso se encuentra por debajo de la mediana y se aleja más conforme aumenta la edad en el grupo alimentado con la fórmula de soja, siendo la puntuación similar en el grupo alimentado con el hidrolizado de caseína y el hidrolizado de arroz y en estos casos incluso con una desviación menor que los alimentados con leche materna (*Agostoni et al., 2007*); en este estudio, el tratamiento comienza a los 6 meses de edad, edad a la que la leche materna no es capaz por sí sola de cubrir los requerimientos nutricionales de

los lactantes, y requiere del suministro nutricional adicional de la alimentación complementaria, luego la ganancia pondero-estatural del grupo alimentado con leche materna dependerá en gran medida del correcto suministro de nutrientes a través de la alimentación complementaria y de una óptima absorción intestinal. Estos mismos investigadores observan en aquellos lactantes cuya aceptación de la fórmula y alimentación complementaria es pobre, ya que no finalizan el biberón y/o la ración de alimentación complementaria, una tendencia a menor ganancia de peso e individuos más delgados y unos cambios más bajos en la puntuación Z para el peso (*Agostoni et al., 2007*). De igual manera, en nuestro estudio, la puntuación Z para la relación peso-talla, se situó por encima de la mediana para los niños y por debajo para las niñas, siendo en ambos casos, muy cercana a la mediana, luego no existió en ningún caso riesgo de desnutrición aguda.

En nuestro trabajo, se comparó la evolución de estos parámetros con las tablas de crecimiento de la *WHO*. Llegados a este punto, cabe mencionar que en los trabajos publicados, algunos utilizan las tablas de crecimiento de la *WHO*, otros las tablas de crecimiento de *EuroGrowth* e incluso las tablas de crecimiento del *CDC*; este último organismo recomienda la utilización de estándares de crecimiento de la *WHO* para la valoración del crecimiento desde el nacimiento hasta los 24 meses de edad y la utilización de sus estándares para la monitorización de niños mayores de 2 años de edad.

Otro grupo de investigación, trabajando con los estándares de *EuroGrowth*, observa en peso, talla y perímetro cefálico valores también cercanos a cero en todas las visitas, con la peculiaridad de que la puntuación Z del peso está próximo a -0.5 desviaciones y que en todas las visitas la puntuaciones Z son ligeramente inferiores a los estándares (*Niggemann et al., 2008*). En general en nuestro trabajo, todos los lactantes presentaron un desarrollo pondero-estatural similar al de la población sana, apreciándose una tendencia a mejor percentil de talla que de peso. Cabe destacar que la valoración nutricional de nuestra fórmula en cuanto a medidas antropométricas, se situó mejor que los ensayos encontrados en la bibliografía, sobre valoraciones nutricionales de fórmulas hipoalérgicas; la mayoría de estos ensayos se realizan con hidrolizados proteicos extensos de suero o caseína, sin embargo, la fórmula estudiada por nosotros, contenía una mezcla de hidrolizados

de suero:caseína completamente distinta a las fórmulas encontradas en el mercado.

Si tratásemos de relacionar estos resultados con el consumo medio de nuestra fórmula, los lactantes del estudio consumían una media de $345,4 \pm 227$ ml diarios, volumen inferior al consumo medio observado en otros estudios con otras fórmulas hipoalergénicas: En el ensayo de Menella et al. (2011), el consumo medio de la fórmula extensamente hidrolizada de caseína desde los quince días hasta los 7.5 meses de edad es de 846 ± 40 ml/día; de igual manera el consumo medio de la fórmula extensamente hidrolizada de suero, es de 590 ± 213 ml/día en el ensayo de Niggemann et al. Cabe mencionar que en nuestro estudio, algunos lactantes mantuvieron la lactancia materna junto con el consumo de la fórmula hipoalergénica, a edades inferiores a 6 meses, lo que explica la elevada desviación típica de la ingesta. En nuestro trabajo, el volumen de fórmula ingerido fue menor que el de otras fórmulas, sin embargo la valoración del crecimiento fue óptima, luego cabe pensar, que la introducción de alimentación complementaria también desarrolló un papel importante, pues solo uno de los lactantes del estudio no tomaba alimentación complementaria.

En el estudio de Menella et al. (2011), con una n de 24 lactantes en el grupo alimentado con la con la fórmula extensamente hidrolizada de caseína, la introducción de la alimentación complementaria se produce a los 3.5 meses de edad. La puntuación Z para peso y talla, desde el nacimiento hasta los 7.5 meses de edad presenta un comportamiento similar al de nuestro estudio. Esta puntuación Z comienza con valores negativos hasta los 4.5 meses de edad y aumenta por debajo de los 0.2 desviaciones estándar a partir de esa edad y hasta los 7.5 meses. De nuevo, observamos como la puntuación Z para peso y talla en nuestra fórmula fue mayor que en el caso de lactantes alimentados con la fórmula contemplada en el estudio anterior.

Menella et al. (2011) observan una desviación positiva en la puntuación Z para los lactantes alimentados con una fórmula estándar y mucho mayor que en el caso del hidrolizado. La menor puntuación de Z para el peso, observada con la fórmula anterior también se observa en el resultado de otro estudio, durante los 3 primeros

meses de edad (*Savino et al., 2005*). En este mismo estudio se observa como la puntuación Z para el peso, desde el nacimiento hasta los dos años de edad, presenta una desviación negativa más acusada en los niños alimentados con un hidrolizado de arroz (n=15), seguidos de los alimentados con el hidrolizado extenso de caseína (n=26) y la fórmula de soja (n=17), aunque estas diferencias no fueron significativas (*Savino et al., 2005*). En un estudio retrospectivo realizado en España sobre el crecimiento de los lactantes con APLV, durante los 2 primeros años de vida, se obtiene una puntuación Z para la talla mejor que la obtenida para el peso, hecho observado también en nuestro estudio. El crecimiento de estos lactantes se encuentra dentro de los rangos de referencia de la población española al año y a los 2 años de edad (*Moreno et al., 2006*).

Otro estudio realizado en España, en lactantes con APLV tratados con una fórmula parcialmente hidrolizada de arroz frente a otra forma extensamente hidrolizada de caseína, tiene en cuenta las tablas de crecimiento de la *WHO*, de igual forma que en nuestro estudio. En este ensayo no existen diferencias significativas en la valoración del crecimiento de los lactantes entre ambas fórmulas (*Reche et al., 2010*). La puntuación Z para el peso en ambas fórmulas desde la línea base hasta los 3 meses desde la inclusión en el ensayo, presenta un comportamiento similar al observado en nuestro ensayo, con la peculiaridad de que la desviación estándar es cercana a la mediana pero negativa; luego se vuelve a confirmar que nuestra fórmula desde el punto de vista nutricional se comporta mejor, que la encontrada en el mercado.

Cabe mencionar que en el ensayo de Menella se evalúa el crecimiento desde el nacimiento hasta los 7.5 meses de edad mientras que en el caso del estudio de Agostoni se evalúa desde los 6 meses hasta los 12 meses de edad. En nuestro estudio, la edad de reclutamiento es desde los 0 hasta los 6 meses de edad, pudiendo haber consumido una fórmula hidrolizada distinta a la del estudio un máximo de 2 meses. De esta manera se pone de manifiesto que la comparación de los resultados de la puntuación Z obtenidos en nuestro estudio con los de otros estudios es complicada, pues existen diferencias en los criterios de inclusión (edad de inclusión, alimentación, estado de salud...). Incluso en el tratamiento de los datos (tablas de crecimiento de distintos organismos, recogida de datos...) nos

puede conducir a confusiones, debido a diferencias ocurridas previamente a los tratamientos. Sin embargo, es lógico pensar que nuestra fórmula, de acuerdo a las puntuaciones Z obtenidas, condujo a un crecimiento adecuado en el lactante alérgico, a pesar de estar posiblemente cometiendo un sesgo al comparar los resultados de la *WHO* de lactantes alimentados con lactancia materna exclusiva frente a los lactantes de nuestro ensayo, cuya lactancia antes del reclutamiento varía de un lactante a otro. Aun así se pretendía que, con el consumo de la fórmula, el crecimiento del lactante alérgico se aproximase al crecimiento observado en los lactantes sanos y este es un hecho objetivamente logrado a lo largo de la intervención.

En cuanto a las fórmulas hidrolizadas de arroz, aunque en la actualidad aun no son consideradas como primera opción en el tratamiento de la APLV, en algunos estudios se comprueba que los lactantes con APLV, alimentados con un hidrolizado de arroz, alcanzan también estándares adecuados de crecimiento y, aunque no existen diferencias significativas, alcanzan valores incluso mejores que los alimentados con la fórmula hidrolizada de caseína:suero 40:60 (*Reche et al., 2010*); además, los hidrolizados de arroz presentan una baja alergenicidad y son bien tolerados (*Fiocchi et al., 2003, 2006; Savino et al., 2005; Reche et al., 2010*).

Valoración nutricional resultante de las medidas bioquímicas

En nuestro estudio, los parámetros bioquímicos presentaban valores similares en la visita basal y a los tres meses de tratamiento, sin observarse diferencias estadísticamente significativas y estando todos ellos dentro de los rangos de referencia; solamente la vitamina B₁₂ mostró un aumento estadísticamente significativo, pasando de un valor medio basal de 383,9±248,2 pg/ml a 492,6±226,5 pg/ml al finalizar el seguimiento de 3 meses (p=0,004). En términos generales, son escasos los estudios en los que la valoración nutricional de este tipo de fórmulas incluye los parámetros bioquímicos. Sin embargo, en un ensayo en el que se incluyen estos marcadores se observa, en lactantes con APLV con reducido crecimiento, al ser alimentados, un grupo con un hidrolizado extensivo de suero y otro con una fórmula de soja, al año de edad existe un porcentaje de lactantes con niveles bajos de ferritina (12% vs 7%), zinc (72% vs 60%), volumen corpuscular

medio, VCM (2% vs 10%) y hemoglobina (19% vs 16%), sin existir diferencias significativas entre los tratamientos (*Seppo et al., 2005*). Cabe mencionar que ambos grupos alcanzan parámetros adecuados de crecimiento en relación a los estándares de crecimiento de Finlandia.

Al igual que en el estudio anterior, en nuestro estudio se observó en algunos casos niveles bajos de VCM, hemoglobina y hematocrito. En nuestro ensayo el valor medio de ferritina, indicador de los depósitos de hierro en los tejidos, experimentó una disminución desde la línea basal hasta transcurridos los 3 meses ($58 \pm 62 \mu\text{g/l}$ vs $33 \pm 29 \mu\text{g/l}$). De la misma manera, en un ensayo de valoración nutricional de varios hidrolizados, 2 grupos alimentados, uno con un hidrolizado extenso de caseína y otro con una fórmula experimental, con 15 y 10 lactantes respectivamente, observan niveles más bajos de ferritina ($35 \pm 16 \mu\text{g/l}$ y $32 \pm 13 \mu\text{g/l}$), sin llegar a presentarse una deficiencia en hierro (*Hernell and Lönnerdal, 2003*). Esta disminución también se observa en otro estudio, tanto en el grupo alimentado con una fórmula de soja ($61 \pm 50 \mu\text{g/l}$ vs $30 \pm 16 \mu\text{g/l}$) como en el grupo alimentado con el hidrolizado de suero ($88 \pm 95 \mu\text{g/l}$ vs $44 \pm 13 \mu\text{g/l}$) (*Seppo et al., 2005*).

En nuestro estudio, este hecho no es preocupante pues los niveles de transferrina se mantuvieron constantes durante los 3 meses, indicando que no existía una depleción acusada de los depósitos. Algunos investigadores sostienen que la presencia de pequeños caseino-fosfopéptidos, en las fórmulas extensamente hidrolizadas de caseína, podrían capturar el hierro disminuyendo de esta manera su biodisponibilidad, aunque son necesarios más estudios para sostener esta hipótesis (*Hernell y Lönerdal, 2003*).

En conclusión, desde el punto de vista nutricional, todas las fórmulas que encontramos actualmente en el mercado nacional y europeo, son capaces de proporcionar al lactante con APLV los nutrientes necesarios para un correcto crecimiento. Sin embargo, si observamos la puntuación Z para el peso por edad y para el peso por longitud, la desviación comienza siendo negativa. Con nuestra fórmula terapéutica, cuya relación suero:caseína 80:20 no se encontró en ninguna

fórmula actualmente en el mercado, la desviación se situó en todo momento por encima de la mediana.

Con respecto a la introducción de la alimentación complementaria durante los tres meses del estudio, la situación cambió de un 33.3% que no recibían alimentación complementaria en el momento de reclutamiento a un 4.5% a los 3 meses de seguimiento. La alimentación complementaria durante el ensayo estuvo exenta de leche, huevo, pescado y frutos secos, de acuerdo a las recomendaciones de la AEP de retrasar la introducción de los alimentos más alergénicos (*Comité de Nutrición, AEP 2001*). Sin embargo, las recomendaciones más recientes sostienen que los alimentos que forman parte de la alimentación complementaria deben ser introducidos uno a uno, en pequeñas cantidades y nunca antes de la semana 17. El retraso en la introducción de la alimentación complementaria no ha mostrado ningún efecto preventivo; por tanto, se recomienda que los alimentos más alergénicos (huevo, pescado, trigo) no se eviten, a menos que se demuestre alergia a alguno de ellos (*Dalmau et al., 2008 (AEP); Agostoni et al., 2008 (ESPGHAN); Greer et al., 2008 (AAP); Koletzko et al., 2012 (ESPGHAN)*).

Los resultados derivados de dos estudios prospectivos LISA y GINIplus que han reclutado en total de 9088 lactantes, 2252 de ellos con riesgo de atopía, muestran que, una exposición temprana (antes de las 17 semanas) y muy diversa, ciertamente puede aumentar el riesgo de alergia y una exposición tardía, o incluso evitar los alimentos más alergénicos durante el primer año de vida, no tiene ningún efecto preventivo sobre el desarrollo de alergias (*Zutavern et al., 2008; Sausenthaler et al., 2011*). Los resultados de estos estudios apoyan las actuales recomendaciones publicadas por la AEP (*Dalmau et al., 2008*).

Estatus nutricional de los AGPI-CL ω -3 y ω -6

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, AGPI-CL, concretamente los ácidos docosaheptaenoico, 22:6 ω -3 (DHA) y araquidónico, 20:4 ω -6 (AA), están presentes en la leche materna y prácticamente ausentes en la leche de vaca

(Schwartz et al., 2010). Estos compuestos son fundamentales para el desarrollo cognitivo y la agudeza visual del lactante (Birch et al., 2005; Hoffmann et al., 2009; Innis, 2009); además, son precursores de eicosanoides y docosanoides implicados en la respuesta inmunitaria (Calder, 2006,2010; Gottrand 2008) y en la modulación de funciones de las células T, como su proliferación y la liberación de citocinas en respuesta a los antígenos (Field et al., 2000; Field et al., 2007).

Lactancia materna, lactancia artificial y AGPI-CL

El contenido en DHA y AA en la leche materna varía en función de la dieta de la madre, entre países e incluso en el mismo país (Brenna et al., 2007; Innis, 2009; Gibson et al., 2011, Antonakou et al., 2012); concretamente el contenido en DHA en leche materna puede oscilar entre el 0.06 – 1.4% de los ácidos grasos totales (AGs), con un valor medio de aproximadamente $0.32\pm 0.22\%$ (Brenna et al., 2007; Hoffmann et al., 2009), mientras que los contenidos en AA oscilan entre un 0.24 – 1%, con un contenido medio de $0.47\pm 0.13\%$ (Hoffmann et al., 2009). Se ha observado que la leche materna de madres procedentes de países costeros contiene un mayor contenido en DHA, debido a un mayor consumo de pescado, mientras que la leche materna de madres americanas y países desarrollados se caracteriza por un contenido alto en ácido linoléico y bajo contenido en DHA (Hoffmann et al., 2009; Gibson et al., 2011).

Aunque los lactantes nacidos a término y los prematuros son capaces de sintetizar endógenamente DHA y AA a partir de sus precursores, los ácidos linoleico (LA) y linolénico (LNA), es una práctica habitual la introducción de estos ácidos en las fórmulas infantiles y de continuación, destinadas a la alimentación de lactantes. La fórmula terapéutica utilizada en nuestro estudio fue suplementada con DHA y AA, en una proporción 1:1 y una concentración de 0.47% del total de ácidos grasos. En el mercado nacional y europeo existen otras fórmulas hipoalérgicas terapéuticas, también con DHA y AA con distintas relaciones (1:0; 1:1; 1:2) y distintas concentraciones, desde 0.34% a 0.98% de los AGs.

De acuerdo con la evidencia científica existente con respecto al papel inmunomodulador de los derivados de DHA y AA en la respuesta alérgica, parece

recomendable utilizar en las fórmulas hipoalérgicas ambos ácidos pues, aunque los derivados del ácido araquidónico (PGE2) fomentan la producción de IgE por las células B (Gottrand, 2008), también median en la restricción de la inflamación de la respuesta alérgica aguda (Calder et al., 2010); además, ambos AGPI-CL son necesarios para el correcto desarrollo del sistema inmunitario del lactante.

Marcadores biológicos de los ácidos grasos procedentes de la dieta

El contenido de ácidos grasos en la membrana de los eritrocitos es un marcador adecuado para valorar los ácidos grasos suministrados a través de la dieta durante periodos largos de tiempo, desde las 3 semanas hasta los 3 meses, debido al tiempo de vida media de los eritrocitos (Risé et al., 2007); Sin embargo, encontramos ensayos en los que valoran la ingesta en función del contenido en plasma, e incluso en plaquetas. En el plasma se reflejan los ácidos grasos procedentes de la dieta, de unas horas antes o un día como máximo (Arab, 2003). La composición lipídica de las células se refleja principalmente a través de la composición de los fosfolípidos de membrana, los cuales se verán influidos por la disponibilidad de los ácidos grasos a través de la corriente sanguínea, la cual estará a su vez influida por la dieta y el metabolismo, pudiendo también estar influenciado este último, por la enfermedad (Sala-Vila et al., 2008).

En niños lactados con leche materna, cuyo contenido en DHA es inferior a 0.1% de los AGs, se observan contenidos en la membrana de los eritrocitos similares a los encontrados en lactantes alimentados con fórmulas no suplementadas con DHA y, al igual que sucede con el contenido en DHA en la leche materna, también existe variación en los contenidos de DHA en los eritrocitos de lactantes alimentados a pecho, cuyo contenido es mayor conforme aumenta el contenido en la leche materna (Innis, 2009).

Hoy en día se sabe que las fórmulas con alto contenido en LNA o proporciones pequeñas de LA/LNA no suponen ningún aumento en los niveles de DHA en la membrana de los eritrocitos de los lactantes alimentados con dichas fórmulas (Makrides et al., 2000; Arterburn et al., 2006; Innis 2009), siendo necesaria la suplementación con DHA en las fórmulas para alcanzar niveles similares a los

encontrados en niños amamantados (*Hoffman et al., 2009*). Así pues, en nuestro estudio, tras 3 meses de tratamiento con la fórmula terapéutica, el valor medio en la membrana de los eritrocitos fue de $5.94 \pm 1.01\%$ de AGs en DHA, valores similares a los encontrados en los eritrocitos de lactantes amamantados $5.6 \pm 0.7\%$ de AGs (*Makrides et al., 2000*) y similares también a los encontrados en lactantes sanos, $5.59 \pm 0.20\%$ de AGs en DHA, alimentados con una fórmula extensamente hidrolizada de caseína, con AA y DHA (0.64 y 0.32 % del total de ácidos grasos, ratio 2:1) (*Scalabrin et al., 2009*).

En nuestro estudio, los niveles de AA en la membrana de los eritrocitos, después de tres meses de tratamiento con la fórmula terapéutica, fueron $7.57 \pm 1.51\%$ de los AGs, mientras que en el estudio de Makrides encuentran en lactantes amamantados un $16.1 \pm 0.8\%$ de los AGs y en el estudio de Scalabrin $15.25 \pm 0.38\%$. Sabemos que los contenidos de DHA en la leche materna cambian en función de la ingesta materna del mismo. Debemos mencionar también que distintas concentraciones de DHA ingeridas por madres lactantes se traducen en distintas concentraciones de DHA en la membrana de los eritrocitos de los lactantes, siendo esta concentración mayor cuanto mayor es la ingesta (*Gibson et al., 1997*). Además, varios ensayos clínicos han puesto de manifiesto como la composición lipídica en varios tipos celulares (glóbulos rojos, linfocitos sanguíneos, monocitos) procedentes de lactantes atópicos se caracterizan, en algunos casos, por niveles más bajos de DHA en comparación con niños no atópicos e incluso otros indican niveles bajos de AA (*Sala-Vila et al., 2008*). Por esta razón cabría pensar que un aporte dietético en una correcta combinación de AA y DHA puede ser más eficaz y beneficioso que un aporte únicamente de DHA; sin embargo, podemos encontrar en el mercado nacional e internacional fórmulas terapéuticas adicionadas únicamente con DHA.

En nuestro estudio, la fórmula tenía una proporción LA/LNA de 10:1 y DHA/AA 1:1. Se puede deducir que la similitud de los contenidos de DHA, en la membrana de los eritrocitos de los lactantes con APLV de nuestro estudio, con los encontrados en lactantes sanos amamantados, se deben básicamente a la suplementación con DHA en la fórmula terapéutica, pues de acuerdo a algunos trabajos previos, la relación LA/LNA en las fórmulas debe ser inferior a 6:1 para mejorar el estatus en los lactantes alimentados con fórmula (*Makrides et al., 2000; Jensen et al., 1997*) al

favorecer la síntesis endógena (*Innis et al., 2007*). Además, parece relevante destacar que se adicionó AA y DHA a la fórmula terapéutica y se observó una tendencia al aumento de ambos en la membrana de los eritrocitos de los lactantes con APLV, efecto que de alguna manera podríamos pensar que repercutiría en la presencia de ambos en las células inmunitarias y en el balance T_H1 y T_H2 .

Cabe mencionar que actualmente la EFSA y el Reglamento Europeo 440/2011 aprueban la alegación 'la ingesta de ácido docosahexaenoico (DHA) contribuye al desarrollo visual normal de los niños hasta los 12 meses de edad', siempre que las fórmulas de continuación contengan al menos un 0.3% de los ácidos grasos como DHA. Nuestra fórmula, contenía un 0.47% de los ácidos grasos totales en forma de DHA luego, aunque no fué objeto de estudio en este trabajo, el consumo de DHA a través de esta fórmula podría contribuir al desarrollo visual de los lactantes alérgicos.

AGPI-CL y alimentación complementaria

A partir de los 6 meses de edad, los lactantes comienzan a ser alimentados con dietas semisólidas, siendo más probable una ingesta reducida de DHA desde la dieta. La alimentación del lactante y el niño de corta edad, con menús donde el aporte de LA y LNA mantenga una correcta relación $\omega-6/\omega-3$, puede ser decisivo en el correcto funcionamiento de las rutas de desaturación - elongación, con formación de DHA y AA en proporciones adecuadas para una correcta regulación de las membranas, establecimiento de sinapsis y el desarrollo de agudeza visual (*Matencio et al., 2012*). En nuestro ensayo, la fórmula terapéutica, dentro de la dieta del lactante con APLV, fue la principal fuente de DHA, AA, AL y ALN, hecho que se reflejó en el contenido de estos ácidos en la membrana de los eritrocitos de los lactantes con APLV reclutados.

En relación a la etapa desde los 6 hasta los 12 meses de edad y la disminución del aporte de DHA al disminuir o incluso desaparecer la lactancia materna, existe un estudio en el que en un grupo se suplementa con 130 mg de DHA en 130 g de un tarrito infantil, comparando frente a un grupo control no suplementado. Todos los lactantes habían sido amamantados durante los 6 primeros meses de edad. Se

observa un aumento significativo de DHA en el grupo suplementado desde los 6 a los 12 meses de edad (4.10 ± 0.84 vs 5.50 ± 1.57 $p < 0.002$), mientras que disminuye en el grupo control (3.80 ± 0.94 vs 3.00 ± 1.25) (Hoffman et al., 2004). Este estudio pone de nuevo de manifiesto la disminución de DHA asociada al menor consumo de leche materna durante el segundo semestre de vida. En nuestro estudio, el contenido de DHA en la membrana de los eritrocitos pasó de 4.50 ± 1.28 a 5.94 ± 1.01 a los tres meses de tratamiento con la fórmula; el aumento en DHA en los eritrocitos se debió fundamentalmente al contenido de DHA en la fórmula pues, de acuerdo a los resultados del estudio anterior, el aporte de DHA a través de la alimentación complementaria es mínimo entre los 6 hasta los 12 meses de edad; además, en nuestro estudio al tratarse de lactantes con APLV, no consumían pescado como parte de la alimentación complementaria, siendo este alimento una de las principales fuentes de DHA a través de la dieta, en el periodo de alimentación complementaria.

En relación a la dieta de eliminación a la que son sometidos los niños con APLV, conviene mencionar que un grupo de investigación del País Vasco ha observado, en niños con edades comprendidas entre los 2 y 7 años de edad y con alergias alimentarias múltiples, debido a las limitaciones de su dieta en leche, pescado, huevos y/o vegetales, concentraciones deficientes en LA y LNA y particularmente AGPI-CL ω -3 (DHA y EPA), observando a su vez valores más elevados de los ácidos C18:1 ω -9 y C20:3 ω -9 en plasma, en comparación con un grupo de niños sanos (Aldámiz-Echeverría et al., 2008). Estos resultados ponen de manifiesto la importancia de proporcionar a los lactantes con APLV u otras alergias alimentarias, una correcta combinación de aceites vegetales u otros alimentos que garanticen el aporte de los ácidos grasos esenciales y los AGPI-CL ω -3 y ω -6 en su dieta.

Las alergias alimentarias pueden causar la deficiencia de ácidos grasos esenciales y sus derivados y la deficiencia de estos, o su proporciones inadecuadas, pueden fomentar una respuesta inflamatoria asociada a la alergias (Aldámiz-Echeverría et al., 2008). De hecho, el aumento del ratio ω -6/ ω -3 en la dieta experimentado desde el periodo paleolítico (0.79) hasta hoy en día (15-17:1) debido al elevado consumo de AGPI-CL ω -6, se considera una de las principales razones del aumento de la incidencia de alergias y el aumento del ratio coincide con el aumento de la

incidencia de alergias alimentarias experimentada durante las últimas tres décadas (*Thang et al., 2013*). Además, son ya numerosos los estudios observacionales, y también ensayos clínicos, que muestran como una suplementación con AGPI-CL ω -3, durante el último periodo de gestación (*Furuhjelm et al., 2009; Palmer et al., 2012*), la lactancia y la infancia temprana (*Furuhjelm et al., 2011; D'Vaz et al., 2012*), tiene un efecto protector sobre las alergias.

Biomarcadores de tolerancia antigénica

La mayoría de los estudios que demuestran el papel inmunomodulador de los derivados de los ácidos DHA y AA son estudios en cultivos celulares y estudios con animales; además, numerosos estudios en niños y adultos sugieren una correlación entre la ingesta de los AGPI-CL y ciertas alteraciones en marcadores inmunológicos (*Calder 2008, D'Vaz et al., 2012*).

La intervención con AGPI-CL ω -3 en el periodo gestacional y neonatal, puede alterar el perfil de citocinas (*Gottrand, 2008*). La mayoría de los estudios realizados hasta ahora han demostrado que la suplementación con aceite de pescado durante la gestación y lactancia mejoran los niveles de AGPI-CL ω -3 (*Furuhjelm et al., 2009; Krauss-Etschmann et al., 2008; Dunstan et al., 2003*), pudiendo alterar la función inmunitaria del lactante (*Krauss-Etschmann et al., 2008; Dunstan et al., 2003; Furuhjelm et al., 2011*), reduciendo la sensibilización alérgica (*Furuhjelm et al., 2009, 2011; Palmer et al., 2012*). Sin embargo, son escasos los estudios sobre la suplementación con DHA en lactantes con riesgo de alergia (*Field et al., 2010; D'Vaz et al., 2012*).

Desde el punto de vista inmunológico, y en relación con las alergias, existe un menor contenido de DHA en la leche materna de madres atópicas y este bajo contenido parece tener relación con la aparición de alergias en el lactante (*Duchen et al., 2000*). Pero debemos recordar que este no es el único factor determinante de las alergias, pues se trata de una enfermedad multifactorial.

Como sabemos, la concentración de los ácidos grasos en las células sanguíneas está influenciada por los lípidos aportados por la dieta y por los procesos metabólicos. Estos lípidos son distribuidos a través de la corriente sanguínea entre los distintos compartimentos celulares, incluidas las células inmunitarias (*Sala-Vila et al., 2008*). Esto nos lleva a pensar que las anomalías encontradas, en cuanto a contenidos en DHA y AA en los eritrocitos, pueden reflejar la situación que nos encontraremos en células del sistema inmunitario, con su consecuente efecto en la respuesta inmunitaria. Sin embargo, para estudios inmunológicos lo ideal sería medir los contenidos de ácidos grasos en las células mononucleares sanguíneas (*Witte et al., 2010*), pero esto es prácticamente imposible en estudios con lactantes donde los volúmenes de sangre disponibles son muy limitados.

Cabe mencionar que nuestro trabajo es el primer trabajo donde se estudió el papel de los ácidos grasos, DHA y AA, en la prevención terciaria, es decir, en la modulación de la respuesta alérgica de lactantes alérgicos, con el fin de aliviar los síntomas o contribuir a la tolerancia. Hasta ahora, los trabajos publicados hablan sobre el efecto del DHA en la prevención primaria, tratándose principalmente de estudios con madres gestantes y lactantes suplementadas con DHA y EPA; solo un estudio con una fórmula hipoalérgica enriquecida con DHA y AA, menciona que estos podrían tener algún efecto beneficioso, sin tratar de explicar realmente el mecanismo de acción (*Burks et al., 2008*). En nuestro ensayo hemos tratado de averiguar si existe alguna relación entre la ingesta de DHA y AA presentes en la fórmula terapéutica y el perfil de citocinas en el plasma de lactantes alérgicos.

Considerando la baja frecuencia de células T específicas para alérgenos en las células sanguíneas resulta difícil investigar la funcionalidad de las células T en las alergias (*Tiemessen et al., 2004*). Sin embargo, sabemos que las células T son las responsables de la producción de anticuerpos IgE por las células B; por lo tanto, la activación de las células T constituye la etapa inicial determinante de la respuesta inmune. En nuestro estudio se observó que, tras la ingesta durante tres meses de la fórmula terapéutica, el contenido en DHA en la membrana de los eritrocitos tendió a aumentar a la vez que existió una disminución significativa de los niveles de IL-8, una tendencia a disminuir los niveles en plasma de IL-17A e INF γ , todos ellos marcadores de inflamación, y una tendencia al aumento de la IL-10, citocina

inmunosupresora inhibidora de la producción de citocinas inflamatorias. Algunas publicaciones indican que en la regulación de la respuesta inmune durante la inducción y mantenimiento de la tolerancia, es crucial la producción de citocinas inmunosupresoras, como IL-10, TGF- β o ambas (*Tiemessen et al., 2004*).

Los niveles de IL-10 en sangre del cordón umbilical de niños nacidos de padres alérgicos tienden a ser más bajos que en niños nacidos de padres no alérgicos (*Balossini et al., 2009*). Se observa una correlación negativa entre la producción de IL-10 e IFN- γ por linfocitos aislados de niños con APLV persistente (n=5, edad: 6-14 años), tras ser provocados con PLV (*Tiemessen et al., 2004*). En nuestro ensayo, se observó que la citocina IL-10 tendía a aumentar (8.91 ± 6.70 vs 11.38 ± 9.07), mientras que IFN- γ tendía a disminuir (8.88 ± 10.47 vs 6.76 ± 5.88). Cabe destacar que la disminución de IFN- γ en nuestro ensayo no fue del todo precisa, dada la elevada desviación estándar de las medidas, aunque si se observó una tendencia negativa. Como sabemos, el tratamiento con IFN- γ , en alergias no mediadas por IgE con dermatitis atópica, es una práctica habitual (*Kimata y Lindey, 1994; Noh et al., 2012*). La inmunoterapia con IFN- γ se ha utilizado en la inducción de tolerancia oral, aunque el mecanismo por el cual esta citocina induce tolerancia es aún desconocido (*Noh et al., 2012*).

La generación de IFN- γ es defectuosa en pacientes con APLV, existiendo la hipótesis de que la suplementación con esta citocina podría ayudar a corregir su concentración y por tanto el desequilibrio de la respuesta T_H1/T_H2 , logrando una respuesta inmunitaria normal hacia la LV (*Noh et al., 2012*). Nuestros resultados indican que sería aconsejable una profundización en el estudio del comportamiento de esta citocina en el tratamiento de las alergias y su posible adición a las fórmulas hipoalergénicas.

La producción de IL-10 se relaciona con la remisión de la alergia y juega un papel importante en la persistencia de la APLV (*Tiemessen et al., 2004*). Curiosamente, en un estudio con animales se comprobó que las alergias alimentarias podían ser prevenidas por administración de IL-10 secretado por *Lactococcus lactis* (*Frossard et al., 2007*). Sin embargo, al igual que el IFN- γ se utiliza en los tratamientos de inmunoterapia oral, la utilización de IL-10 está aún bajo investigación, llevándose a

cabo ensayos clínicos en humanos, pues su seguridad aún no se ha establecido y su uso puede tener efectos adversos (*Noh et al., 2012*).

En nuestro estudio, los lactantes con APLV experimentaron una tendencia al aumento de IL-10. Cabe pensar que este incremento podría ser debido a que se está generando esta citocina, pues solamente las células dendríticas (DCs) de las placas de Peyer, y no las del bazo, pueden ser exclusivamente inducidas para secretar altos niveles de IL-10, modulador de la respuesta tolerogénica (*Spiekermann y Walker, 2001*). Esta citocina se está aportando también a través de la leche materna (*Piirainen et al., 2009*). Esto, en conjunto, favorece el desarrollo de una inmunotolerancia. La disminución de la actividad de las células Treg se ha identificado como factor determinante de la alergia, asociándose el desarrollo de la tolerancia a una regulación de la respuesta Treg en niños con historial de APLV (*Fiocchi et al., 2010*).

En relación a la tendencia al aumento de IL-10 observada en nuestro estudio debemos mencionar que un grupo de investigadores observan, en un ensayo con animales alimentados con una dieta rica en AGPI-CL ω -3 y tras ser inducida una dermatitis de contacto, un aumento de IL-10, pudiendo ser esta citocina la responsable del efecto antiinflamatorio ejercido por los AGPI-CL ω -3 (*Sierra et al., 2004*). Thang y col. observan en ratones alimentados con una dieta alta en AGPI-CL ω -3 y sensibilizados con β -lactoglobulina, un aumento significativo en la producción *ex vitro* de la citocina IL-10, que no se observa cuando los ratones fueron alimentados con una dieta rica en AGPI-CL ω -6. Los AGPI-CL ω -3 pueden regular directamente la función de las células T a través de la fluidez de la membrana celular, la señalización celular y la transcripción génica (*Calder, 2002*). En niños con alto riesgo la suplementación de la dieta de la madre y/o lactante con DHA y EPA pueden regular la respuesta inmune y modular el desarrollo de alergias mediadas por IgE (*D'Vaz et al., 2012; Palmer et al., 2012; Furuhjelm et al., 2011*).

En nuestro estudio también se observó un descenso en los niveles de eosinófilos ($1457,54 \pm 2570,21$ vs $417,39 \pm 402,98$ cel/mm³). Al comienzo del estudio los valores son muy altos, por encima de los valores considerados como límite máximo (0 - 700 células/mm³), presentando la mayoría de los lactantes con APLV reclutados, eosinofilia; sin embargo, tras 3 meses de tratamiento con la fórmula

terapéutica, estos valores volvían a encontrarse dentro del rango establecido. Un aumento del número de eosinófilos en sangre es típico en las enfermedades alérgicas (*Stone et al., 2010*). De hecho, la infiltración de eosinófilos es una característica común de las lesiones intestinales causadas por alergias alimentarias (*Dupont y Heyman, 2000*).

En nuestro estudio se observó una disminución significativa de IL-8 en plasma. IL-8 es una citocina cuya concentración en la leche materna de madres atópicas se encuentra elevada (*Böttcher et al., 2003*). La concentración de IL-8 en plasma suele estar elevada en sujetos con dermatitis atópica, observándose como disminuye significativamente cuando la dermatitis mejora tras la aplicación de un tratamiento (*Kimata and Lindley, 1994*). En nuestro estudio se encontraron lactantes con diagnóstico evidente de APLV, de acuerdo a los resultados de los test de prick, a los niveles de IgE en suero, a los resultados de las pruebas de provocación y a los niveles elevados de eosinófilos. Sin embargo, era de esperar que estos lactantes con APLV presentasen también concentraciones elevadas en plasma IL-4 e IL-13 antes del tratamiento con la fórmula terapéutica.

Con respecto a este comportamiento, recientemente se ha publicado en *Pediatrics* un estudio de un caso en el que se observan resultados similares a nuestros análisis de citocinas. Se trata de un lactante nacido a término que, tras su primera ingesta de una fórmula infantil de inicio, experimenta a las 36 horas, evacuación de heces sanguinolentas (hematoquezia). De acuerdo con la clínica y los resultados de laboratorio fue diagnosticado como un lactante con APLV. El diagnóstico se estableció a partir de niveles elevados de eosinófilos en heces, aunque sus niveles de IgE en suero no fueron elevados, al igual que sus niveles de IL-4 e IL-13, TNF- α y IFN- γ . Sin embargo, los niveles de IL-5 en suero fueron elevados y la eliminación de la LV de la dieta resolvió la sintomatología (*Koike et al., 2011*). En nuestro caso los niveles de IgE y eosinófilos fueron elevados al comienzo del estudio y, aunque concretamente IL-4 e IL-13 no fueron elevados, si lo estaba IL-8.

Existe un estudio sobre sepsis en neonatos donde se analizan citocinas de respuesta T_H1/T_H2 e inflamatoria como IL-8, mediante la misma tecnología utilizada en nuestro ensayo. En este caso se detectan niveles elevados de IL-8, en niños de

menos de un mes con infecciones y no se detecta IL-4 (*Hodge et al., 2004*). Cabe mencionar que el aumento aislado en plasma de una sola citocina no es indicador de infecciones neonatales; por tanto, es necesario medir más de una citocina y, en el caso de lactantes, nos encontramos con limitaciones en los volúmenes de sangre a extraer y requeridos en los métodos inmunoenzimáticos. Esta técnica de barrido de citocinas, donde se emplean volúmenes muy pequeños de plasma (50-100 μ l), resulta ser relativamente rápida, sensible y eficaz en el diagnóstico de enfermedades relacionadas con alteraciones de la respuesta inmunitaria.

Koike et al. (2011) se plantean que la citocina IL-5 se debería tener en cuenta en el diagnóstico de la APLV, durante el periodo neonatal. En nuestro caso nos planteamos si la IL-8 podría también ser útil en el diagnóstico y el estudio del curso de la enfermedad durante el periodo neonatal; además, en España, el síntoma más frecuente de alergia durante el primer año de vida es la dermatitis atópica y precisamente la IL-8 es un marcador adecuado en esta dolencia. Seguimos sin resolver la cuestión sobre la interrelación entre la dermatitis atópica y la APLV. La APLV se presenta en el 30% a 40% de los lactantes con dermatitis atópica, aunque la dermatitis atópica puede cursar con APLV y la APLV puede manifestarse a través de una dermatitis atópica (*Schade et al., 2000*).

En nuestro estudio, los lactantes con APLV tratados nutricionalmente con la fórmula terapéutica experimentaron una tendencia al aumento de IL-10 a los tres meses. Esta tendencia junto con la ausencia en plasma de IL-4 e IL-13, la disminución estadísticamente significativa de IL-8 y de los niveles de eosinófilos, la tendencia al aumento de DHA y AA en la membrana de los eritrocitos y la ausencia de efectos adversos o episodios de APLV, contribuye a la evidencia científica sobre los niveles de DHA y la modulación de la respuesta alérgica, previamente aportada por grupos de investigación de diferentes países y de reconocido prestigio (*Calder et al., 2010, Prescott y Calder., 2004, Dunstan et al., 2003, Furuholm et al., 2009...*), tratando todos ellos la prevención primaria.

Actualmente, solo hemos encontrado un ensayo publicado en el *British Journal of Nutrition* en el que se plantean, al igual que nosotros, evaluar el efecto de una fórmula infantil, suplementada con DHA y AA, en la respuesta inmunitaria. En este

caso se trata de lactantes sanos y mide poblaciones linfocitarias y la producción de citocinas por los linfocitos al ser estimulados estos últimos, de manera *ex - vitro* mediante un antígeno microbiano (PHA). Observan una respuesta inmunológica similar a la encontrada en el grupo con lactancia materna, además de un aumento claro de DHA y AA en los fosfolípidos del plasma (*Field et al., 2007*). Existe otro estudio sobre los efectos en el crecimiento, tolerancia y seguridad, de una fórmula elemental suplementada con DHA y AA en niños alérgicos, en la que sostienen que, la adicción de DHA puede proporcionar efectos anti-inflamatorios, aunque no analizan el contenido de ácidos grasos en eritrocitos ni citocinas en plasma (*Burks et al., 2008*).

Recientemente se han publicado los resultados de un ensayo clínico con un planteamiento similar al de nuestro trabajo dirigido a la prevención primaria. Estos demuestran que al suministrar aceite de pescado, que contiene 280 mg de DHA y 110 mg de EPA, diariamente, desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad a lactantes con alto riesgo de alergia, aumentaba significativamente el contenido en DHA en la membrana de los eritrocitos con respecto al grupo placebo (DHA: 6.82 ± 1.74 vs 6.22 ± 1.59 , $p < 0,05$). Además, observaron que la respuesta IL-13 hacia la β -lactoglobulina es significativamente menor ($p = 0.002$); y una respuesta más alta de IFN- γ y TNF- α hacia el estímulo PHA (*D'Vaz et al., 2012*). Este estudio aporta más evidencias para soportar científicamente la relación entre el aporte postnatal de AGPI-CL ω -3 y sus propiedades inmunoduladoras, siendo potencialmente protectoras frente al desarrollo de alergias.

A su vez, otros investigadores han demostrado que la suplementación con aceite de pescado, durante la gestación de madres atópicas, disminuye la incidencia acumulada de alergias mediada por IgE durante los dos primeros años de vida (*Furuhjelm et al., 2011*). En otro estudio se sostiene que la suplementación con aceite de pescado a madres gestantes atópicas, no disminuye la incidencia de alergias mediadas por IgE durante el primer año de vida, pero sí se producía una disminución del eczema atópico y la sensibilización al huevo (*Palmer et al., 2012*).

Nuestro ensayo es el primer ensayo que trató de establecer o llegar a dilucidar si se podría apoyar científicamente la relación entre la ingesta de DHA y AA a través de

la fórmula con la prevención terciaria. Para ello trató de correlacionar la presencia de DHA y AA en la membrana de los eritrocitos con la mejora de sintomatología y perfil de citocinas en el plasma de lactantes con APLV. Por supuesto, somos conscientes de las limitaciones de nuestro ensayo, en cuanto a tamaño de muestra y factores de confusión tales como, la alimentación complementaria, lactancia mixta y lactancia con la fórmula terapéutica, las distintas edades de los lactantes y otros. Todos estos factores pudieron afectar al correcto desarrollo del sistema inmunitario. En la actualidad no se conoce ninguna estrategia nutricional efectiva en la prevención terciaria, siendo claramente necesarios más estudios longitudinales de intervención nutricional (*Torres et al., 2012*).

Independientemente de que podamos establecer una relación basada en la evidencia entre el perfil de citocinas en plasma y los niveles de DHA y AA en la membrana de los eritrocitos, podemos afirmar lo siguiente:

- Existió absorción de DHA y AA procedente de la fórmula terapéutica, fue efectiva y aumentó los niveles de estos ácidos grasos "semi-esenciales", durante esta etapa del desarrollo.
- La detección de un perfil de citocinas bien establecido en el diagnóstico y durante el curso de la enfermedad, podría ser de gran utilidad.

CONCLUSIONES

Primera

La nueva fórmula terapéutica ha demostrado ser adecuada para el tratamiento nutricional de los lactantes con APLV; su idoneidad se pone de manifiesto desde el inicio, en los ensayos del valor biológico de los hidrolizados y posteriormente con los resultados obtenidos en la valoración del crecimiento, puntuación Z de peso y talla.

Segunda

Desde el punto de vista nutricional, el consumo de la nueva fórmula terapéutica, con relación de proteínas de caseína:suero C:S 20:80, junto con la alimentación complementaria, han logrado mejores puntuaciones Z del crecimiento que las observadas en estudios anteriores al nuestro, cuyas fuentes proteicas se caracterizan por proceder de hidrolizados de caseína (relación C:S 100:0), hidrolizados de suero (relación C:S 0:100) o incluso hidrolizados de arroz.

Tercera

La caracterización físico-química de la fórmula, los resultados obtenidos en la prueba de provocación oral con la fórmula terapéutica y la ausencia de episodios de reagudización durante los 3 meses de tratamiento relacionados directamente con el consumo de la misma, nos permiten confirmar la seguridad y tolerancia de la fórmula, para el tratamiento de niños con alergia a las proteínas de leche de vaca, de acuerdo con los criterios establecidos y aceptados por los distintos organismos científicos.

Cuarta

El contenido de DHA y AA en la fórmula terapéutica, 0.47% de los ácidos grasos totales, se traduce en un contenido en DHA y AA en la membrana de los eritrocitos similar a los encontrados en niños lactados al pecho. Los niveles de LA y LNA

encontrados en la membrana de los eritrocitos antes y después del tratamiento no experimentaron cambios significativos, ni tendencia al aumento, poniendo de manifiesto que los niveles de DHA y AA se deben a su aporte nutricional a través de la fórmula en estudio.

Quinta

La disminución significativa en plasma en los niveles de la citocina proinflamatoria IL-8, marcador de inflamación intestinal, junto con la disminución significativa en los niveles de eosinófilos en sangre, son indicadores de que la fórmula terapéutica es bien tolerada por el lactante con APLV.

Sexta

La tendencia al aumento de IL-10 en el plasma de los lactantes con APLV, tratados con la nueva fórmula terapéutica junto con el conocimiento de que esta citocina solamente es generada por la células dendríticas de las placas de Peyer, hace pensar que el aumento de esta citocina está relacionado con el efecto antiinflamatorio ejercido por los AGPI-CL ω -3.

Séptima

En la nueva fórmula terapéutica, se han identificado numerosos péptidos bioactivos con funcionalidad antihipertensiva, antioxidante, inmunomoduladora. No podemos sostener que estos péptidos ejerzan alguna de las funciones atribuidas, debido a que no hemos realizado ensayos *in vitro* e *in vivo* para alegar tal fin. Esta es una de las líneas de investigación que se abre ante nosotros, pues se ha identificado un péptido con actividad inmunomoduladora y cabría la posibilidad de estudiar su funcionalidad en la respuesta alérgica.

Conclusión general

Los resultados obtenidos en la realización de esta tesis proporcionan soporte científico novedoso, a una nueva fórmula extensamente hidrolizada destinada al tratamiento de la APLV, cuya composición nutricional y características alergénicas cumple con los requerimientos establecidos por los organismos científicos. Esta fórmula ha demostrado ser un vehículo idóneo para asegurar el aporte de DHA y AA a los lactantes con APLV. La presencia de DHA y AA en la fórmula terapéutica podría estar ejerciendo un papel en la disminución de la respuesta alérgica y el desarrollo de la tolerancia. Este estudio piloto es el primer estudio que analiza el papel de estos ácidos en la disminución de la respuesta alérgica en lactantes con alergia a las proteínas de leche de vaca es decir, en la prevención terciaria.

En las últimas décadas se ha observado a nivel mundial un aumento de la prevalencia de alergias incluido las alergias alimentarias. Durante la infancia, el primer alérgeno alimentario que entra en contacto con el lactante es la leche de vaca. En la mayoría de los casos las formulas infantiles de inicio o continuación introducidas en la alimentación infantil, son bien toleradas por los lactantes y aseguran un estado nutricional adecuado. Sin embargo, se han descrito casos en los que los lactantes desarrollan una respuesta alérgica tras la exposición a este tipo de fórmulas. En España, los datos de incidencia de alergia inmediata a proteínas de leche de vaca en el lactante oscila entre el 0.4% y el 1.9%.

El único tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca en lactantes diagnosticados, es la eliminación de leche de vaca de su dieta y la alimentación siempre y cuando sea posible a través de la lactancia materna. Solo en aquellos casos en los que la lactancia no es posible, se recurrirá a la alimentación mediante fórmulas especialmente diseñadas para el tratamiento de la alergia a las proteínas de la leche de vaca. Hoy en día se conoce la efectividad de los hidrolizados proteicos para el tratamiento nutricional, sin embargo exista aún un vacío con respecto al papel que podrían desempeñar algunos ingredientes funcionales en la prevención terciaria de la enfermedad.

Este trabajo se llevó a cabo con el objetivo de asegurar un aporte nutricional adecuado al lactante diagnosticado con alergia a la proteína de la leche de vaca, así como evitar la ingesta accidental de la proteína causante de la enfermedad evitando la reaparición de los síntomas relacionados con dicha ingesta. Por otra parte y de acuerdo a la evidencia científica existente sobre el papel de los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3, concretamente DHA, en la prevención primaria de algunas alergias, se consideró la posibilidad de que la presencia de DHA y AA en la fórmula terapéutica, tuviese algún papel inmunomodulador en la prevención terciaria de la enfermedad.

Durante el desarrollo de este trabajo, se realizó una primera fase de validación de la fórmula hipoalergénica terapéutica de acuerdo a los criterios establecidos por los distintos organismos científicos. Para ello se realizaron desde ensayos en el

laboratorio desde un punto de vista nutricional y antigénico, hasta ensayos en animales y finalmente un ensayo clínico con lactantes diagnosticados. Todos estos ensayos demostraron como la nueva fórmula terapéutica, era segura para el tratamiento de la APLV, tolerada por más del 90% de los lactantes con APLV y aseguraba un aporte nutricional capaz de asegurar un crecimiento óptimo en lactantes con APLV. La fórmula diseñada para tal fin, resultó presentar una composición proteica (relación caseína: suero) distinta a las encontradas actualmente en el mercado internacional, mostrando una puntuación Z en peso mejorada con respecto a las encontradas en el mercado. En esta primera fase de caracterización y validación de la fórmula, se llevó a cabo la identificación de péptidos bioactivos en dicha fórmula, tras ser sometida a una digestión *in vitro* gastrointestinal. Se identificaron numerosos péptidos bioactivos con tamaños inferiores a 1000 Da. Se puso de manifiesto la posibilidad de aislar péptidos de la fórmula y comprobar su papel funcional mediante el desarrollo de un nuevo proyecto de investigación; Aunque también cabe la posibilidad de que existan sinergias entre los péptidos encontrados en la actual composición de la fórmula terapéutica y la funcionalidad sea incluso más efectiva que en el caso de los péptidos aislados.

La leche materna es el alimento idóneo para el correcto desarrollo de los lactantes. Contiene los nutrientes necesarios además de compuestos funcionales tales como los AGPI-CL ω -3 y ω -6 que intervienen en el desarrollo del sistema inmune del lactante. En lactantes con alergia se observan niveles disminuidos de DHA y AA en la membrana de los eritrocitos. En la segunda fase de nuestro trabajo se comprobó que la fórmula terapéutica enriquecida en DHA y AA era capaz de asegurar el estatus de estos ácidos, hasta niveles similares a los encontrados en lactantes sanos alimentados con lactancia materna. La concentración de DHA y AA en la fórmula terapéutica en estudio fue de 0.47% de los AGs alcanzando niveles en la membrana de los eritrocitos que no se alcanzan, según bibliografía, con concentraciones inferiores o incluso en ausencia de estos ácidos en las fórmulas o incluso con un mayor porcentaje de los precursores, LA y LNA, en dichas fórmulas. En nuestro estudio se ha puesto de manifiesto que el estatus de DHA y AA en los lactantes con APLV se debe a la ingesta de estos a través de la fórmula, pues el aporte de estos ácidos a través de la alimentación complementaria es

prácticamente nulo. La fuente alimenticia más importante de DHA a través de la alimentación complementaria es el pescado, y dicho consumo en nuestro estudio no era posible de acuerdo a las recomendaciones de retrasar la introducción de pescado en la dieta del lactante con alergia.

El papel del DHA en la prevención de enfermedades alérgicas, está siendo investigado durante las últimas décadas. Hoy en día se sabe que DHA y AA son precursores de sustancias implicadas en la respuesta inmune que participan en distintas etapas de la respuesta inmunitaria. En los últimos años se ha relacionado un excesivo consumo de AA y AGPI-CL ω -6 con el aumento de las enfermedades alérgicas. Sin embargo, durante las primeras etapas de la vida AA y DHA, son necesarios en proporciones adecuadas para el correcto desarrollo, entre otros, del sistema inmune. Además derivados de AA también median en la restricción de la inflamación de la respuesta alérgica aguda. En la tercera fase de nuestro trabajo, tratamos de elucidar si existía algún efecto beneficioso relacionado con la ingesta de estos ácidos, DHA y AA, a través de la fórmula terapéutica y la disminución de la respuesta alérgica en los lactantes con APLV. Para ello se realizó un screening de citocinas en plasma antes y después del tratamiento con la fórmula terapéutica. Se observó una disminución significativa de la citocina IL-8, marcador de inflamación intestinal y citocina característica de la dermatitis atópica, y una disminución de los niveles de eosinófilos, cuyos niveles elevados son comunes en las lesiones intestinales causadas por alergias alimentarias, aunque no se encontró una correlación entre los niveles de DHA y AA en la membrana de los eritrocitos y los niveles de citocinas en plasma. Cabe pensar que el tamaño de muestra es uno de los factores limitantes de los resultados encontrados durante el desarrollo de este ensayo.

En la investigación sobre la adquisición de la tolerancia a alérgenos alimentarios, se están llevando a cabo terapias como la inmunoterapia oral con INF- γ . Actualmente se está investigando la inmunoterapia oral con IL-10. En nuestro estudio se observa una tendencia al aumento de esta citocina tras los tres meses de tratamiento con la fórmula terapéutica enriquecida con DHA y AA. Solamente las células dendríticas de las placas de Peyer son inducidas para producir altos niveles de esta citocina. Esta

citocina parece estar relacionada con el efecto antiinflamatorio ejercido por los AGPI-Cl ω -3.

Este trabajo se realizó con el fin de aportar soporte científico al papel de los AGPI-CL ω -3 y ω -6 en la prevención terciaria así como contribuir al correcto crecimiento y desarrollo de lactantes con APLV, mediante una fórmula con una composición nutricional distinta a las encontradas en el mercado internacional. Como en todos los trabajos de investigación, durante el desarrollo de este trabajo, se han encontrado nuevas líneas de investigación para continuar y desarrollar dentro del ámbito de la alergia a las proteínas de la leche de vaca.

During the last decades the prevalence of food allergies has been getting higher in the worlwide. For childhood the first food allergen is the cow's milk. Infant and follow on formulas are designed with cow's milk protein and they are usually are good tolerated for healthy infants, assessing an optimal nutritional status. However, it is known that the introduction of infant formula in the infant feeding could case allergy in infant at risk. In Spain cow's milk protein allergy prevalence is around 0.4% to 1.9%.

The elimination of cow's milk in the diet of cow's milk allergic infants is the unique effective treatment. Breast-feeding must be maintained as long as it could be possible. In case that breastfeeding were not possible, we would resort to hypoallergenic formulas such as extensively hydrolysed formula, hydrolysed rice formula, amino acid formula. Nowadays there is enough scientific evidence about the role of extensively hydrolysed formula in the cow's milk protein allergy; however there is still a big gap in the role of several functional ingredients in the third prevention.

The main objectives of this work were to ensure an adequate nutritional support for cow's milk protein allergic infants and avoid the accidental intake of cow's protein by the allergic infants. Indeed, according with the current scientific evidence about the role of long chain polyunsaturated fatty acids ω -3 in the first prevention of the atopic disease, we considered the possibility to study the effects of DHA and AA, added in therapeutic formula, in the third prevention of cow's milk allergy.

First phase was developed to validate the nutritional properties, safety and tolerance of the therapeutic formula in the cow's milk protein allergy treatment, taking into account scientific criteria established by different international scientific bodies. Laboartory test, in vivo murine model and clinical trial were developed and they showed that the new therapeutic formula were safe and able to provide an adequate nutritional status in infants with cow's milk protein allergy. It is relevant to mention that the new therapeutic formula contained an exclusive casein:whey ratio, not found until now in the current market. Infants fed with this new therapeutic formula achieved an improved z score in weight than other showed in other studies with different hydrolysates. Bioactive peptides with molecular weight

lower than 1000 Da, were also identified in this new therapeutic formula, after simulated *in vitro* digestion. In relation with the antioxidant bioactive peptides, immunomodulatory and ACE inhibitory bioactive peptides identified, at this moment, we can only mention that an important new research project could be turned up.

Human milk is the gold standard; Nutrients and functional compounds are found in its composition, such as DHA and AA involved in the visual acuity, brain development and even the development of the immune system. It seems that allergic infants have low levels of DHA and AA in red blood cells membrane. In the second phase, we tried to justify that whether the therapeutic formula was fortified with DHA and AA in amounts close to levels found in human milk, with the intake of this formula, cow's milk protein allergic infants could achieve DHA and AA in red blood cells membrane similar to levels found in breast fed infants. DHA and AA in our formula is 0.47 % of total fatty acids. Levels of DHA and AA achieved with this new therapeutic formula are not achieved whether the concentration is lower or in cases with formulas without DHA and AA. In our study, DHA and AA status is achieved by DHA and AA found in therapeutic formula, because it seems that weaning food supports minimum amount of this semi-essential fatty acids. Indeed fish could be the main source of DHA from weaning food and in our clinical trial fish is not allowed according to delay the introduction of fish intakes in allergic infants.

There is scientific evidence about the role of DHA in the first prevention of atopic diseases. Infants have the complete systems to synthesise DHA and AA from LNA and LA. However the ratio is low and these fatty acids can be also provided by the human milk and diet. DHA and AA are precursors of other compounds involved in the immune response. During the last decades, an excessive AA and ω -6 fatty acids consumption has been related with the allergic appearance. However infants need AA and DHA in an adequate amount to a right immune system development. Indeed AA is also involved in the resolution of the inflammation processes. In the third phase, we tried to elucidate whether the consumption of DHA and AA from the therapeutic formula could be linked to the decrease allergic response in cow's milk allergic infants enrolled in our study. For this reason, we performed a cytokines screening in plasma at the enrolment and three months later. IL-8,

intestinal inflammatory marker and cytokine increased in atopic dermatitis, significantly decreased before the nutritional treatment with this new formula. The same situation was shown in the case of eosinophils. High levels of them have been observed in intestinal damage caused by food allergies. However a correlation between DHA and AA levels in red blood cells and levels of cytokines in plasma were not found. But we wonder whether the small sample size could be the cause.

We observed a trend to increase IL-10 after the treatment with the therapeutic formula. Only DCs found in peyer's patches are induced to produce high levels of this cytokine IL-10. It seems that this cytokine is linked to anti-inflammatory effects carried out by LC-PUFA ω -3.

This work was performed with the aim to provide scientific evidence about the role of LC-PUFA ω -3 and ω -6 in the third prevention through an new therapeutic formula with an innovative casein:whey ration. This research is not ended. We are finding new way of research to face in the future in relation with cow's milk protein allergy prevention and treatment.

- AESAN (2007).** Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias. Revista del Comité Científico de la AESAN nº5
- Agostoni C (2008).** Role of Long-chain Polyunsaturated Fatty Acids in the First Year of Life. *JPGN* 47: S41-S44
- Agostoni C, Fiocchi A, Riva E, Terracciano L, Sarratud T, Martelli A, Lodi F, D'Auria E, Zuccotti G and Giovannini M (2007).** Growth of infants with IgE-mediated cow's milk allergy fed different formulas in the complementary feeding period. *Pediatr Allergy Immunol* 18:599-606.
- Aldamiz-Echeverría L, Bilbao A, Andrate F and Elorz J (2008).** Fatty acid deficiency profile in children with food allergy managed with elimination diets. *Acta Paediatrica* 97: 1572-1576
- Alexander DD and Cabana MD (2010).** Partially Hydrolyzed 100% Whey Protein Infant Formula and Reduced Risk of Atopic Dermatitis: A Meta-analysis. *JPGN* 2010;50: 422-430
- American Academy of Pediatrics, Committee on Nutrition (1976).** Commentary on breast-feeding and infant formulas, included proposed standard formulas. *Pediatrics* 57, 278-285.
- American Academy of Pediatric. Committee on Nutrition (2000).** Hypoallergenic Infant Formulas. *Pediatrics* Vol 106. No 2
- Antonakou, A., Skenderi, K. P., Chiou, A., Anastasiou, C. a, Bakoula, C., & Matalas, A.-L. (2012).** Breast milk fat concentration and fatty acid pattern during the first six months in exclusively breastfeeding Greek women. *Eur J Nutr*
- AOAC (2000).** Official Method 960.48 Protein Efficiency Ratio Rat Bioassay. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th Edition, 2000; 45:62-63
- AOAC (2000).** Protein in milk. Kjeldahl method. Method 991.20. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th Edition, 2000; 33:10-11
- Antunes J, Borrego LM, Quieroz A, Chambel M, Romeira MA, Pinto P (2009).** Allergy to extensively hydrolysed formulas. *Allergol Immunopathol (Madr)*.37(5):272-278
- Arab L (2003).** Biomarkers of fat and fatty acid intake. *J Nutr* 133(Suppl 3):925S-932S
- Arterburn LM, Hall EB, Oken H (2006).** Distribution, interconversion, and dose response of w-3 fatty acids in humans. *Am J Clin Nutr.* 83(6):1467S-1476S
- Artis D (2008).** Epithelial cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nature Reviews* Vol 8.
- Arguelles F (2003).** Las proteínas en la alimentación del lactante. *VOX PAEDIATRICA* 11,1 (22-25).
- Bahna SL (2002).** Cow's milk allergy versus cow milk intolerance. *Ann Allergy Asthma Immunol* 89(Suppl):56-60.
- Balossini V, Monzani A, Rapa A, Vivenza D, Caristo E, Oderda G (2009).** Interleukin-10 and transforming growth factor- β 1 in cord blood: relationship with paternal allergy and cesarean section. *Acta Paediatrica* 98: 812-816.
- Baylon E, Cuoto-Sola M, Utrilla P, Rodríguez-Ruiz J, Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Xaus J, Gálvez J and Comalada M (2012).** A shorter and more specific oral sensitization-based experimental model of food allergy in mice. *Journal of Immunological Methods* 381: 41-49
- Black PN, Sharpe S (1997).** Dietary fat and asthma: is there a connection? *Eur Respir J* 10: 6-12.
- Blanc F, Bernard H, Alessandri S, Bublin M, Paty E, Leung SA, Patient KA,**

- Wal JM. (2008).** Update on optimized purification and characterization of natural milk allergens. *Mol. Nutr. Food Res.* 52, S166 –S175
- Bindslev-Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U (2004).** . Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods–position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy* 59: 690–697.
- Birch EE, Castañeda YS, Wheaton DH, et al (2005).** Visual maturation of term infants fed long-chain polyunsaturated fatty acid-supplemented or control formula for 12 mo. *Am J Clin Nutr* 81:871–9.
- Bizulevicius GA, Kislukhina OV, Kazlauskaite J, Zukaite V (2006)** Food protein enzymatic hydrolysates possess both antimicrobial and immunostimulatory activities: a “cause and effect” theory of bifunctionality. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46: 131–138
- Björkstén B (2008).** Environmental influences on the development of the immune system: consequences for disease outcomes. *Nestlé Nutrition Workshop Series Pediatric Program* 61:243-54
- Boné J, Claver A, Plaza AM (2009).** Allergic proctocolitis, food-induced enterocolitis: immune mechanism, diagnosis and treatment. *Allergo et Immunopathol.* 37(1): 36-42
- Boner AL, Benedetti M, Spezia E, Piacentini GL, Bellanti JA (1992).** Evaluation of the allergenicity of infant formulas in a guinea pig model. *Ann Allergy.* 68(5):404-6.
- Böttcher MF, Fredriksson J, Hellquist A and Jenmalm MC (2003).** Effects of breast milk from allergic and non-allergic mothers on mitogen- and allergen-induced cytokine production. *Pediatr Allergy Immunol* 14: 27–34
- Boudry G, David ES, Douard V, Monteiro VI, Huerou-Luron I and Ferraris RP (2010).** Role of Intestinal Transporters in Neonatal Nutrition: Carbohydrates, Proteins, Lipids, Minerals, and Vitamins. *JPGN* 51: 380–401
- Bousoño C, Ramos E, García M, Taborga E, Jiménez S, Crespo M (2007).** Manifestaciones gastrointestinales de alergia alimentaria. *BOL PEDIATR* 47: 228-236
- Boza J., Martínez-Augustin O. and Gil A. (1995).** Nutritional and Antigenic Characterization of an Enzymatic Whey Protein Hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 43, 872-875.
- Boza J, Jiménez J, Martínez O, Suárez MD and Gil A (1994).** Nutritional Value and Antigenicity of Two Milk Protein Hydrolysates in Rats and Guinea Pigs. *J. Nutr.*124: 1978-1986.
- Boza J, Moënnos D, Vuichoud J, Jarret AR, Gaudard-de-Weck D Ballèvre O (2000).** Protein hydrolysate vs free amino acid-based diets on the nutritional recovery of the starved rat. *Eur J Nutr* 39:237–243.
- Bozzetto S, Carraro S, Giordano G, Boner A, Baraldi E (2012).** Asthma, allergy, and respiratory infections: the vitamin D hypothesis. *Allergy* 67:10-17
- Brenna JT, Varamini B, Jensen RG, Diersen-Schade DA, Boettcher JA, Arterburn LM. (2007)** Docosahexaenoic and arachidonic acid concentrations in human breast milk worldwide. *Am J Clin Nutr.* 85:1457-1464.
- Burks W, Jones SM, Berseith C, Harris C, Sampson HA, Scalabrin D (2008).** Hypoallergenicity and Effects on Growth and Tolerance of a New Amino Acid-Based Formula with Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid. *J Pediatr* 153:266-71
- Caffarelli C, Plebani A, Poiesi C, Petroccione T, Spattini A, Cavagni G (2002).** Determination of allergenicity to three cow's milk hydrolysates and an amino acid-derived formula in children with cow's milk allergy. *Clin Exp Allergy* 32(1):74-9.
- Calder PC (2006).** n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr* 83(suppl):1505S-1519S.
- Calder PC (2007).** Immunological Parameters: What do they means?. *J Nutr* 137:773S-780S

- Calder PC, Kremmyda LS, Vlachava M, Noakes PS, Miles EA (2010).** Is there a role for fatty acids in early life programming of the immune system? *Proc Nutr Soc* 69:373-80.
- Calder P (2008).** The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 79: 101-108
- Camargo CA Jr, Clark S, Kaplan MS, Lieberman P, Wood RA (2007a).** Regional differences in EpiPen prescriptions in the United States: the potential role of vitamin D. *J Allergy Clin Immunol* 120:131-6.
- Camargo CA Jr, Rifas-Shiman SL, Litonjua AA, Rich-Edwards JW, Weiss ST, Gold DR, Kleinman K, Gillman MW (2007b).** Maternal intake of vitamin D during pregnancy and risk of recurrent wheeze in children at 3 y of age. *Am J Clin Nutr* 85(3):788-95.
- Carvalho NF, Kenney RD, Carrington PH, Hall DE (2001).** Severe nutritional deficiencies in toddlers resulting from health food milk alternatives. *Pediatrics*.107: E46.
- Català-Clariana S, Benavente F, Giménez E, Barbosa J, Sanz-Nebot V (2010).** Identification of bioactive peptides in hypoallergenic infant milk formulas by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 683 119-125
- Chirico D, Marzollo R, Cortinovis S, Fonte C and Gasparoni A (2008).** Antiinfective Properties of Human Milk. *J. Nutr.* 138: 1801S-1806S
- Ciprandi G, De Amici M, Murdaca G, Fenoglio D, Ricciardolo F, Marseglia G, Tosca M. (2009).** Serum interleukin-17 levels are related to clinical severity in allergic rhinitis. *Allergy* 64: 9: 1375-8.
- Cochrane S, Beyer K, Clausen M., Wjst M., Hiller R., Nicoletti C., Szeftalusi Z., Savelkoul H, Breiteneder H, Manios Y, Crittenden R, Burney P (2009).** Factors influencing the incidence and prevalence of food allergy. *Allergy*, 64(9), 1246-55.
- Comité de Nutrición de la Sociedad Española de Pediatría AEP (2001).** Recomendaciones sobre el uso de fórmulas para el tratamiento y prevención de las reacciones adversas a proteínas de la leche de vaca. *An Esp Pediatr* 54:372-379
- Commins SP, Borish L and Steinke JW (2010).** Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. *J Allergy Clin Immunol* 125:S53-72
- Coombes JL and Powrie F (2008).** Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews* Vol 8
- Cordle C, Duska-McEwen G, Rueda R and Vázquez E (2011):** Animal models for assessing hypoallergenic clinical performance potential of products based on hydrolyzed protein systems. *Clinical and Translational Allergy (Suppl1):O17*
- Dalmau J, Martorell A y el Comité de Nutrición de la Asociación Española de Pediatría (2008).** Alergia a proteínas de leche de vaca: Aspectos nutricionales. *An Pediatr (Barc)*. 68(3):295-300.
- Daniel H (2004).** Molecular and Integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu. Rev. Physiol.* 66:361-84
- Davidovits M, Levy Y, Avramovitz T, Eisenstein B (1993)** Calcium-deficiency rickets in a four-year-old boy with milk allergy. *The Journal of Pediatrics*; Vol. 122, Issue 2, Pages 249-251.
- Directiva 89/398/CEE** del Consejo, de 3 de mayo de 1989, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los productos alimenticios destinados a una alimentación especial
- Directiva 2006/141/CE** de 22 de diciembre de 2006 relativa a los preparados para lactantes y preparados de continuación y por la que se modifica la Directiva 1999/21/CE
<http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006L0141:20081028:ES:PDF>
- Devereux G (2005).** The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol* 6:869-74.

De Goicoechea E, Torre R y Lorente F (2009). Guía para el tratamiento de lactantes con alergia a proteínas de leche de vaca: Ficha comparativa de las fórmulas especiales disponibles en el mercado español. *BOL PEDIATR* 2009; 49: 3-15

Docena G., Rozenfeld P., Fernández R., Fossati CA. (2002). Evaluation of the residual antigenicity and allergenicity of cow's milk substitutes by in vitro tests. *Allergy* 57: 83-91

Dreger M (2003) Emerging strategies in mass-spectrometry based proteomics. *Eur J Biochem* 270: 569

Duchen K, Casas R, FageraÈ s-BoÈ ttcher M, Yu G, BjoÈ rksteÅn B (2000). Human milk polyunsaturated long-chain fatty acids and secretory immunoglobulin A antibodies and early childhood allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 11:29-39

Dunder T, Kuikka L, Turtinen J, Rasanen L, Uhari M (2001). Diet, serum fatty acids, and atopic diseases in childhood. *Allergy* 56:425- 8.

Dupont C and Heyman M (2000). Food protein induced enterocolitis syndrome:laboratory perspectives. *JPGN* (30):S50-57

Dupont C, Mandalari G, Molle D, Jardin J, Rolet-Re´pe´caud O, Duboz G, Le´onil J., Mills C and Mackie AL (2010). Food processing increases casein resistance to simulated infant digestion. *Mol. Nutr. Food Res.* 54, 1677-1689

Dupont, C, Chouraqui, J. P, de Boissieu D, Bocquet A, Bresson J. L., Briend A, Darmaun, Frelut ML, Ghisolfi J, Girardet JP, Goulet O, Hankard R, Rieu D, Vidailhet M and Turck D(2012). Dietary treatment of cows' milk protein allergy in childhood: a commentary by the Committee on Nutrition of the French Society of Paediatrics. *The British journal of nutrition*, 107(3), 325-38.

Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL (2003). Maternal fish oil supplementation in pregnancy reduces interleukin-13 levels

in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clin Exp Allergy.* 33:442-8

D'Vaz N, Meldrum SJ, Dunstan JA, Lee-Pullen TF, Metcalfe J, Holt BJ, Serralha M, Tulle MK, Mori TA, Prescott SL (2012). Fish oil supplementation in early infancy modulates developing infant immune responses. *Clin & Exp Allergy* 42: 1206-16

EFSA, 2004. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission relating to the evaluation of allergenic foods for labelling purposes. *EFSA J.* 32,1-197.

European Society of Pediatric Allergy and Clinical Immunology (1993). Hydrolysed cow's milk formulae. Allergenicity and use in treatment and prevention. An ESPACI position paper [see comments] [published erratum appears in *Pediatr Allergy Immunol* 1995;6:56]. *Pediatr Allergy Immunol* 4:101-11.

ESPGAN Committee on Nutrition, Aggett PJ, Haschke F, Heine W, Hernell O, Koletzko B, Rey J, Rubino A, Schöch G, Senterre J, Strobel S and Tormo R (1993). Comment on antigenreduced infant formulae. *ESPGAN* 82:314-19.

ESPGAN . Committee on Nutrition. Guidelines on infant nutrition. I (1993). Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediatr Scan Suppl* 262: 1-20

ESPGHAN Committee on Nutrition. Guidelines on infant nutrition. I (1977). Recommendations for the composition of an adapted formula. *Acta Paediat Scand* 3: Suppl 262.

ESPGHAN Committee on Nutrition. Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Neto, U. F, Gopalan S, Hernell O, Hock Q. S, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y and Zong-Yi D(2005). Global standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *JPGN*, 41(5), 584-99.

ESPGHAN Committee on Nutrition: Agostoni C, Axelsson I, Goulet O,

- Koletzko B, Michaelsen K.F, Puntis J, Rieu D, Rigo J, Shamir R, Szajewska H and Turck D (2006).** Medical Position Paper Soy Protein Infant Formulae and Follow-On Formulae: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *JPGN* 42:352-61
- ESPGHAN Committee on Nutrition: Agostoni, C, Decsi T, Fewtrell M, Goulet O, Kolacek S, Koletzko B, Michaelsen KF, Moreno L, Puntis J, Rigo J, Shamir R, Szajewaska H, Turck D, van Goudoever J (2008).** Complementary feeding: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *JPGN* 46(1), 99–110
- ESPGHAN Committee on Nutrition: Agostoni, C, Braegger C Decsi, T, Kolacer S, Koletzko, B, Michaelsen, KF., Mihatsch W, Moerno LA, Puntis J, Shamir R, Szajewska H Tucrk D, van Godouver J (2009).** Breast-feeding: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition, *JPGN* 49:112-25
- Fenaille F, Parisod V, Tabet J-C, Guy PA (2005).** Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions. *Proteomics*. 5: 3097–3104.
- Ferranti P (2004)** Mass spectrometric approach for the analysis of food proteins. *Eur J Mass Spectrom* 10: 349–358
- Field CJ (2005).** The Immunological Components of Human Milk and Their Effect on Immune Development in Infants. *J. Nutr.* 135: 1–4
- Field CJ, Thomson CA, Van Aerde JE, Parrott A, Euler A, Clandinin MT (2000).** Lower proportion of CD45R01 cells and deficient interleukin-10 production by formula-fed infants, compared with human-fed, is corrected with supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 31:291-9
- Field CJ, Van Aerde JE, Robinson LE and Clandinin MT (2007).** Effect of providing a formula supplemented with long-chain polyunsaturated fatty acids on immunity in full-term neonates. *Br J Nutr* 1-9
- Field CJ, Van Aerde J, Goruk S and Clandinin T (2010)** Effect of Feeding a Formula Supplemented With Long chain Polyunsaturated Fatty Acids for 14 Weeks Improves the Ex Vivo Response to a Mitogen and Reduces the Response to a Soy Protein in Infants at Low Risk for Allergy. *JPGN* 50: 661–669
- Fiocchi A, Travaini M, Sala M, Silano M, Fontana P and Riva E (2001).** Allergy to cow's milk in beef-allergic children. *Ann Allergic Asthma Immunol* 86:64
- Fiocchi A, Travaini M, DAuria E, Banderali G, Bernardo L, Riva E (2003).** Tolerance to a rice hydrolysate formula in children allergic to cow's milk and soy. *Clin Exp Allergy* 33: 1576–80.
- Fiocchi A, Restani P, Bernardini R, Lucarelli S, Lombardi G, Magazzù G, Marseglia GL, Pittschieler K, Tripodi S, Troncone R, Ranzini C. (2006).** A hydrolyzed rice-based formula is tolerated by children with cow's milk allergy: a multicentremstudy. *Clin Exp Allergy*; 36:311–6.
- Fiocchi A, Brozek J, Schünemann H, Bahna SL, von Berg A, Beyer K, Bozzola M, Bradsher J, Compalati E, Ebisawa M, Guzmán MA, Li H, Heine RG, Keith P, Lack G, Landi M, Martelli A, Rancé F, Sampson H, Stein A, Terracciano L, Vieths S; World Allergy Organization (WAO) Special Committee on Food Allergy. (2010).** World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Protein Allergy (DRACMA) Guidelines. *WAO. Pediatr Allergy Immunol* 21 (Suppl. 21): 1–125
- Fiocchi A, Restani P, Leo G, Martelli A, Bouygue GR, Terraciano L, Ballabio C and Valsasina R (2003).** Clinical Tolerance to Lactose in Children with Cow's Milk Allergy. *Pediatrics* 112:359 –362
- Fitzsimon N, Fallon U, O'Mahony D, Loftus BG, Bury G, Murphy AW, Kelleher CC; Lifeways Cross Generation Cohort Study Steering Group. (2007).** Mothers' dietary patterns during pregnancy and risk of asthma symptoms in children at 3 years. *Ir Med J* 100(suppl):27-32.
- Fomon SJ, Filer LJ, Thomas LN and Roger R (1970).** Growth and Serun Chemical Values of Normal Breastfed Infants. *Acta Paediatrica* 59; S202: 3-20

- FrancaVilla R, Calasso M, Calace L, Siragusa S, Ndagijimana M, Vernocchi P, Brunetti L, Mancino G, Tedeschi G, Guerzoni E, Indrio F, Laghi L, Miniello VL, Gobbetti M, De Angelis M. (2012).** Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy.
- Fritsché R (2003).** Animal models in food allergy: assessment of allergenicity and preventive activity in infant formula. *Toxicology letters* 140-141 303-301
- Fritsché R and Bonzon M (1990).** Determination of cow milk formula in the rat model by in vitro mast cell triggering and in vivo IgE induction. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol* 93: 289-293
- Fritsche R, Pahud JJ, Pecquet S, Pfeifer A. (1997)** Induction of systemic immunologic tolerance to beta-lactoglobulin by oral administration of a whey protein hydrolysate. *J Allergy Clin Immunol.* 100:266-73.
- Frossard CP, Steidler L and Eigenemann PA (2007).** Oral administration of an IL-10 secreting *Lactococcus lactis* strain prevents food induced IgE sensitization
- Fomon SJ and Ziegler EE (1995).** Carga renal de solutes y agua. En "Nutrición del lactante". Ed. Fomon, S.J. Ed Mosby/Doyma libros.
- Fujinari E and Damon J (1997).** Determination of molecular-mass distribution of food-grade protein hydrolyzates by size-exclusion chromatography and chemiluminescent nitrogen detection. *Journal of Chromatography A* 763: 323-329
- Furuhjelm C, Warstedt K, Larsson J, Fredriksson M, Böttcher MF, Fälth-Magnusson K, Duchén K (2009).** Fish oil supplementation in pregnancy and lactation may decrease the risk of infant allergy. *Acta Pædiatrica* ISSN 0803-5253
- Furuhjelm C, Warstedt K, Fagerås M, Fälth-Magnusson K, Larsson J, Fredriksson M, Duchén K (2011).** Allergic disease in infants up to 2 years of age in relation to plasma omega-3 fatty acids and maternal fish oil supplementation in pregnancy and lactation. *Pediatr Allergy Immunol.* 22(5):505-14
- García C, Pedrosa M, Belver MT, Martín MF, Quirce S and Boyano T (2013).** Efficacy and safety of oral desensitization in children with cow's milk allergy according to their serum specific IgE level. *Ann Allergy Asthma Immunol* 110 (2013): 290-294
- Garcia MC, Boyano MT, Diaz Pena JM, Martin F, Reche M, Martin M (2001).** Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cow's milk protein in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 107:185-90.
- Giampietro PG, Kjellman N-IM, Oldaeus G, Wouters-Wesseling W, Businco L (2001).** Hypoallergenicity of an extensively hydrolyzed whey formula. *Pediatr Allergy Immunol* 2001: 12: 83±8
- Gibson R, Muhlhausle B. and Makrides, M. (2011).** Conversion of linoleic acid and alpha-linolenic acid to long-chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs), with a focus on pregnancy, lactation and the first 2 years of life. *Maternal & child nutrition*, 7 (2): 17-26.
- Gibson R, Neumann MA and Makrides M (1997).** Effect of increasing breast milk docosahexaenoic acid on plasma and erythrocyte phospholipid fatty acids and neural indices of exclusively breast fed infants. *European Journal of Clinical Nutrition* 51: 578-584
- Gil, A., Uauy, R., Nutrición, C. D., & Aep, D. (2006).** Bases para una alimentación complementaria adecuada de los lactantes y los niños de corta edad, *An Pediatr (Barc)* 65(5):481-95
- Gil M, Dalmau J y Comité de Nutrición de la Sociedad Española de Pediatría (2010).** Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *An Pediatr (Barc)* 2010 73(3): 142e1-142e8
- Gómez-Llorente C, Muñoz S and Gil A (2010).** Early programming of the immune system and the role of nutrition. Role of Toll-like receptor in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Br J Nutr* 69:381-389

Gomis R, Arellano C, Parra P, Calle JE, Oliver A, García R, Quiñonero M (2009). Lactancia materna en la Región de Murcia. ¿Seguimos con el problema?

González-Tello P, Camacho F, Jurado E, Páez MP and Guadix Em (1994). Enzymatic hydrolysis of whey proetins II. Molecular-Weight Range. *Biotechnology and Bioengineering* (44): 529-532

Gottrand F (2008). Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids Influence the Immune System of Infants. *J. Nutr.* 138: 1807S-1812S.

Greer FR, Sicherer SH, Burks W, MD, and the Committee on Nutrition and Section on Allergy and Immunology (2008). 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* 121:183-191

Guarner F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Gill HS, Mcguirk P, Van Eden W, Versalovic J, Weinstock JV and Rook GA (2006). Mechanism of disease: The hygiene hypothesis revisited. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3, 275-84.

Halken S (2004). Prevention of allergic disease in childhood: clinical and epidemiological aspects of primary and secondary allergy prevention. *Pediatr Allergy Immunol* 15 (Suppl. 16): 9-32

Halken S, Hansen KS, Jacobsen HP, Estmann A, Faelling AE, Hansen LG, Kier SR, Lassen K, Lintrup M, Mortensen S, Ibsen KK, Osterballe O, Høst A. (2000). Comparison of a partially hydrolyzed infant formula with two extensively hydrolyzed formulas for allergy prevention: a prospective, randomized study. *Pediatr Allergy Immunol* 11:149-61.

Halken S, Host A, Hansen LG, Osterballe O (1993). Safety of a new, ultrafiltrated whey hydrolysed formula in children with cow's milk allergy: a clinical investigation. *Pediatric and Immunology* 4:53-59

Hayes M, Stanton C, Slattery H, O'Sullivan O, Hill C, Fitzgerald GF and Ross RP (2007). Casein Fermentate of *Lactobacillus animalis* DPC6134 Contains a

Range of Novel Propeptide Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitors. *Applied and Environmental Microbiology* 4658-4667

Henriksen C, Eggesbø M, Halvorsen R, Botten G (2000). Nutrient intake among two-year-old children on cow's milk-restricted diets. *Acta Paediatr.* 89: 272-278.

Hernell O and Lönnerdal B (2003). Nutritional evaluation of protein hydrolysate formulas in healthy term infants: plasma amino acids, hematology, and trace elements. *Am J Clin Nutr* 78:296-301.

Hernández-Ledesma B, Quiros A, Amigo L, Recio I (2007). Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *Int Dairy J* 17: 42-49

Hernández-Ledesma B, Recio I and Amigo L (2008). β -Lactoglobulin as source of bioactive peptides. *Amino Acids* 35: 257-265

Hodge G, Hodge S, Haslam R, Mcphee A, Sepulveda H, Morgans E, Nicholson I and Zola H (2004). Rapid simultaneous measurement of multiple cytokines using 100 ml sample volumes association with neonatal sepsis *Clin Exp Immunol* 137:402-407

Hoffman DR, Wheaton DK, James KJ, Tuazon M, Diersen-Schade DA, Harris CL, Stolz S, Berseth CL. (2006). Docosahexaenoic acid in red blood cells of term infants receiving two levels of long-chain polyunsaturated fatty acids. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*42:287-292.

Hoffmann DR, Bottecher JA, Diersen-Schade DA (2009). Toward optimizing vision and cognition in term infants by dietary docosahexaenoic and arachidonic acid supplementation: A review of randomized controlled trials. *PLEFA* 81:151-58

Hoffman DR, Theuer RC, Castañeda YS, Wheaton DH, Bosworth RG, O'Connor AR, Morale SE, Wiedemann LE, Birch EE. (2004). Maturation of visual acuity is accelerated in breast-fed term infants fed baby food containing DHA-enriched egg yolk. *J Nutr* 134(9):2307-13

- Horak E, Morass B, Ulmer H (2007).** Association between environmental tobacco smoke exposure and wheezing disorders in Austrian preschool children. *Swiss Med Wkly*; 137: 608-13.
- Host A and Halken S (2004).** Hypoallergenic formulas – when, to whom and how long: after more than 15 years we know the right indication! *Allergy* 59 (Suppl. 78): 45–52
- Host A, Halken S, Jacobsen HP, Christensen AE, Herskind AM, Plesner K (2002).** Clinical course of cow's milk protein allergy/intolerance and atopic diseases in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 13(suppl 15):23-8.
- Host A (1994).** Cow's milk protein allergy and intolerance in infancy. Some clinical, epidemiological and immunological aspects. *Pediatr Allergy Immunol* 5 Suppl 5: 1–36.
- Host A (2002).** Frequency of cow's milk allergy in childhood. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 89 (Suppl):S33-37.
- Host A., Koletzko B., Dreborg S., Muraro A., Wahn U., Aggett P., Bresson JL., Hernell O., Lafeber H., Michaelsen KF, Micheli JL, Rigo J., Weaver L, Heymans H., Strobel S., Vandenplas Y. (1999).** Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint statement of the European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition *Arch Dis Child* 80; 81:80–84.
- Huang J, Ushiyama T, Inoue K, Kawasaki T, and Hukuda S (2000)** Vitamin D receptor gene polymorphisms and osteoarthritis of the hand, hip, and knee: a case-control study in Japan. *Rheumatology*; 39(1): 79-84.
- Hunsberger M, Lanfer A, Reeske A, Veidebaum T, Russo P, Hadjigeorgiou C, Moreno LA, Molnar D, De Henauw S, Lissner L, Eiben G. (2012).** Infant feeding practices and prevalence of obesity in eight European countries - the IDEFICS study. *Public health nutrition*, 1–9.
- Ibero M, Boné J, Martín B, Martínez J (2010).** Evaluation of an extensively hydrolysed casein formula (Damira 2000) in children with allergy to cow's milk proteins. *Allergologia et immunopathologia* 38(2):60-68
- Infante D, Tormo R y Conde M (2003).** Empleo de la leche de cabra en pacientes con alergia a las proteínas de la leche de vaca. *An Pediatr (Barc)* 59(2): 138-42
- Innis SM (2007)** Dietary (n-3) fatty acids and brain development. *J Nutr* 137:855–859
- Innis SM (2009).** Omega-3 Fatty Acids and Neural Development to 2 Years of Age: Do We Know Enough for Dietary Recommendations? *JPGN* 48:S16–S24
- Institute of Medicine (2010).** Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.
- Isolauri E, Suittas Y, Salo M, Isosomppi R, Kaila M (1998).** Elimination diet in cow's milk allergy: risk for impaired growth in young children. *J Pediatr* 132:1004 –9.
- Jensen CL, Prager TC, Fraley JK, Chen HM, Anderson RE, Heird WC (1997).** Effect of dietary linoleic/alpha-linolenic acid ratio on growth and visual function of term infants. *J Pediatr* 131:200–9.
- Johansson SG, Hourihane JO, Bousquet J, Brujnzeel-Koomen C, Dreborg S, Haahtela T, Kowalski ML, Mygind N, Ring J, van Cauwenberge P, van Hage-Hamsten M, Wüthrich B; EAACI (the European Academy of Allergology and Clinical Immunology) nomenclature task force. (2001).** A revised nomenclature for allergy: an EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. *Allergy* 56:813-24
- Johansson SG, Bieber T, Dahl R, Friedmann PS, Lanier BQ, Lockey RF, Motala C, Ortega Martell JA, Platts-Mills TA, Ring J, Thien F, Van Cauwenberge P, Williams HC. (2004).** Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, *J Allergy Clin Immunol*.113:832-6.
- Johnson CC, Ownby DR, Alford SH, Havstad SL, Williams LK, Zoratti EM,**

- Peterson EL, Joseph CL. (2005).** Antibiotic exposure in early infancy and risk for childhood atopy. *J Allergy Clin Immunol* 115:1218-24.
- Keil T, McBride D, Grimshaw K, Niggemann B, Xepapadaki P, Zannikos K, Sigurdardottir ST, Clausen M, Reche M, Pascual C, Stanczyk AP, Kowalski ML, Dubakiene R, Drasutiene G, Roberts G, Schoemaker AF, Sprikkelman AB, Fiocchi A, Martelli A, Dufour S, Hourihane J, Kulig M, Wjst M, Yazdanbakhsh M, Szépfalusi Z, van Ree R, Willich SN, Wahn U, Mills EN, Beyer K. (2010).** The multinational birth cohort of EuroPrevall: background, aims and methods. *Allergy*, 65(4), 482-90.
- Kessel A and Dalal I (2011).** The pendulum between food protein-induced enterocolitis syndrome and IgE-mediated milk allergy. *Acta Pædiatrica* ISSN 0803-5253
- Kimata H and Lindely I (1994).** Detection of plasma interleukin-8 in atopic dermatitis. *Archives of Disease in Childhood* 70:119-22
- Koike Y, Takahashi N, Yaa Y, Kawamata R, Sato and Momoi MY (2011).** Selectively high level of serum interleukin 5 in a newborn infant with cow's milk allergy
- Kohmura, M., N. Nio, K. Kubo, Y. Minoshima, E. Munekata, and Y. Ariyoshi. (1989).** Inhibition of angiotensin I-converting enzyme by synthetic peptides of human β -casein. *Agric. Biol. Chem.* 53:2107-2114.
- Koletzko S, Niggemann B, Arato A, Dias J.A, Heuschkel R, Husby S, Mearin ML, Papadopoulou A, Ruemmele FM, Stainao A, Schäppi MG and Vandenplas Y (2012).** Diagnostic approach and management of cow's milk protein allergy in infants and children: ESPGHAN GI Committee Practical Guidelines. *JPGN* 55(2): 221-229
- Korhonen H, Pihlanto A (2006).** Bioactive peptides: Production and functionality *Int. Dairy J.* 16: 945-960.
- Khorn T,¹ Bettell Ei, Oukka M and Kuchroo VK (2009).** IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 27:485-517
- Krauss-Etschmann S, Hartl D, Rzehak P, Heinrich J, Shadid R, Del Carmen Ramírez-Tortosa M, Campoy C, Pardillo S, Schendel DJ, Decsi T, Demmelmair H, Koletzko BV; Nutraceuticals for Healthier Life Study Group. (2008).** Koletzko for the Nutraceuticals for Healthier Life Study Group. Decreased cord blood IL-4, IL-13, and CCR4 and increased TGF- β levels after fish oil supplementation of pregnant women. *J Allergy Clin Immunol* 121:464-70
- Kukkonen K, Kuitunen M, Haahtela T, Korpela R, Poussa T, Savilahti E (2010).** High intestinal IgA associates with reduced risk of IgE-associated allergic diseases. *Pediatr Allergy Immunol* 21: 67-73
- Kulig M, Luck W, Wahn U (1999).** The association between pre- and postnatal tobacco smoke exposure and allergic sensitization during early childhood. Multicentre Allergy Study Group. Germany. *Hum Exp Toxicol* 18:241-4.
- Lahov, E., & Regelson, W. (1996).** Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food and Chemical Toxicology*, 34(8):131-45
- Lannerö E, Wickman M, van Hage M, Bergstrom A, Pershagen G, Nordvall L (2008).** Exposure to environmental tobacco smoke and sensitisation in children. *Thorax* 63:172-6.
- Lara-Villoslada, F., M. Olivares, J. Jiménez, J. Boza, and J. Xaus (2004).** Goat milk is less immunogenic than cow milk in a murine model assay of atopy. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 39:354-360.
- Lawlor, D. A., Riddoch, C. J., Page, A. S., Andersen, L. B., Wedderkopp, N., Harro, M., et al. (2005).** Infant feeding and components of the metabolic syndrome: findings from the European Youth Heart Study. *Archives of Disease in Childhood*, 90, 582-588.
- Levy J (2000).** The effects of antibiotic use gastrointestinal function. *Am J Gastroenterol* 95(suppl):S8-10.

- Li X.M, Schofield B.H, Huang C.K., Kleiner GI and Sampson HA (1999).** A murine model of IgE mediated cow's milk hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 103:206-14
- Linneberg A, Petersen J, Gronbaek M, Benn CS (2004).** Alcohol during pregnancy and atopic dermatitis in the offspring. *Clin Exp Allergy* 34:1678-83.
- Longo G, Barbi E, Berti I, MD, Meneghetti R, Pittalis A, Ronfani L and Ventura A (2008).** Specific oral tolerance induction in children with very severe cow's milk-induced reactions. *J Allergy Clin Immunol* 121:343-7.
- Madsen, C. B., Hattersley, S., Allen, K. J., Beyer, K., Chan, C.-H., Godefroy, S. B., Hodgson, R., et al. (2012).** Can we define a tolerable level of risk in food allergy? Report from a EuroPrevall/UK Food Standards Agency workshop. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 42(1), 30-7.
- Majamaa H, Aittoniemi J and Miettinen A (2001).** Increased concentration of fecal α 1-antitrypsin is associated with cow's milk allergy in infants with atopic eczema. *Clinical and Experimental Allergy* 31:590-592
- Makrides M, Neuman MA, Jeffrey B, et al (2000).** A randomized trial of different ratios of linoleic to α -linoleic acid in the diet of term infants: effects on visual function and growth. *Am J Clin Nutr* 71:120-9.
- Maloney J and Nowak-Wegrzyn A (2007).** Educational clinical case series for pediatric allergy and immunology: Allergic proctocolitis, food protein-induced enterocolitis syndrome and allergic eosinophilic gastroenteritis with protein-losing gastroenteropathy as manifestation of non-IgE-mediated cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 18:360-367.
- Martín M, García MC, Banqué M, Boyano MT, Martín F and Díaz JM (1998).** Evaluation of an extensively hydrolyzed casein-whey protein formula in immediate cow's milk protein hypersensitivity. *JPGN* 26: 398-401
- Martin M, Wellner A, Ossowski I, Henle T (2008).** Identification and Quantification of Inhibitors for Angiotensin-Converting Enzyme in Hypoallergenic Infant Milk Formulas *J. Agric. Food Chem.* 56: 6333-633
- Marks G, Mahrshahi S, Kemp A, Tovey E, Webb K, Almqvist C, et al (2006).** Leader for the Childhood Asthma Prevention Study team Sydney, Australia. Prevention of asthma during the first 5 years of life: A randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 118:53-61
- Martínez O and Martínez E (2006).** Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr Hosp* 21 (suppl 2) 1-14
- Martorell A, De la Hoz B, Ibáñez MD, Bone J, Terrados MS, Michavila A, Plaza AM, Alonso E, Garde J, Nevot S, Echeverria L, Santana C, Cerdá JC, Escudero C, Guallar I, Piquer M, Zapatero L, Ferré L, Bracamonte T, Muriel A, Martínez MI, Félix R (2011).** Oral desensitization as a useful treatment in 2-year-old children with cow's milk allergy. *Clinical & Experimental Allergy*, 1-8.
- Matencio E, Muñoz S, Olza J, Santamaría S, Romero F, Abellán P and Gil A (2011).** Nutricional value of two protein hydrolysates selected for the design of a new therapeutic infant formula. *Clinical and Translational Allergy* 1(Suppl 1):P113.
- Matencio E, Muñoz S, Olza J, Santamaría S, Gil A, Romero F and Abellán P (2010).** An oral antigenicity study with hydrolysates to design a new hypoallergenic infant formula. P20. *Skin Allergy Anaphylactic Meeting*
- Matencio E, Abellán P y Romero, F (2012).** Funcionalidad y recomendaciones nutricionales de ácidos grasos esenciales y sus derivados en la alimentación del lactante a partir de los 6 meses de edad. *Enfermería global* nº 25. ISSN 1695 - 6141
- Mazurak V.C, Lien V., Field C.J, Goruk S.D, Pramuk K, and Clandinin M.T (2008).** Long-chain Polyunsaturated Fat Supplementation in Children With Low Docosahexaenoic Acid Intakes Alters Immune Phenotypes Compared With Placebo. *JPGN* 46:570-9
- McBride, D., Keil, T., Grabenhenrich, L., Dubakiene, R., Drasutiene, G., Fiocchi, a, Dahdah, L., et al. (2012).** The

EuroPrevall birth cohort study on food allergy: baseline characteristics of 12,000 newborns and their families from nine European countries. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 23(3), 230–9.

Meglio P, Bartone E, Plantamura M, Arabito E, Giampietro PG (2004). A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy* 59:980-987.

Meglio P, Giampietro PG, Gianni S and Galli E (2008). Oral desensitization in children with immunoglobulin E-mediated cow's milk allergy – follow-up at 4 yr and 8 months. *Pediatr Allergy Immunol* 19: 412–419

Menella JA, Ventura AK and Beauchamp Gk (2011). Differential Growth Patterns Among Healthy Infants Fed Protein Hydrolysate or Cow-Milk Formulas. *Pediatrics* 127:110-118.

Meyer R, Venter C, Fox AT, Shah N (2012). Practical dietary management of protein energy malnutrition in young children with cow's milk protein allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 23(4):307-14.

Miguel M, Recio I, Ramos M, Delgado MA, Aleixandre MA (2006). Antihypertensive effect of peptides obtained from *Enterococcus faecalis*-fermented milk in rats. *J Dairy Sci*. 2006 Sep;89(9):3352-9.

Monaci L, Tregoat V, van Hengel AJ, Anklam E (2006). Milk allergens, their characteristics and their detection in food: a review. *Eur Food Res Technol* 223: 149-179

Moreno J, Oliveros L, Torres R, Luna C, Martínez A y García G (2006). ¿Como crecen los lactantes diagnosticados de alergias a proteínas de leche de vaca? *An Pediatr Barc* 64(3):244-7

Monti G, Bertino E, Muratore MC, Coscia A, Cresi F, Silvestro L. (2007). Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatr Allergy Immunol*. 18: 258–264

Mullally MM, Meisel H, FitzGerald RJ. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activities of gastric and pancreatic proteinase digests of whey proteins. *Int Dairy J* 7:299-303.

Muraro (2011). Proposed requirements for hypoallergenic formulae to be used in the treatment and prevention of cow's milk allergy. *Clinical and Translational Allergy (Suppl 1)*:S72.

Murukami M, Tonouchi H, Takahashi R, Kitazawa H, kawai Y, Negishi H and Saito T (2004). Structural analysis of a new anti -hypertensive peptide (β -lactosin B) isolated from a commercial whey product. *J Dairy Sci* 87: 1967-1974

Nagaoka, S., Y. Futamura, K. Miwa, T. Awano, K. Yamauchi, Y. Kanamaru, K. Tadashi, and T. Kuwata. (2001). Identification of novel hypocholesterolemic peptides derived from bovine milk beta-lactoglobulin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281:11–17.

Negele K, Heinrich J, Borte M, von Berg A, Schaaf B, Lehmann I, et al (2004). Mode of delivery and development of atopic disease during the first 2 years of life. *Pediatr Allergy Immunol* 15:48-54.

Niggemann B and Beyer K (2007). Diagnosis of Food Allergy in Children: Toward a Standardization of Food Challenge. *JPGN* 45: 399-404.

Niggemann B, Berg a von, Bollrath C, et al (2008). Safety and efficacy of a new extensively hydrolyzed formula for infants with cow's milk protein allergy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology* 19(4):348-54.

Nilsson C, Oman H, Halldén G, Lilja G, Lundberg M, Härfast B (1999). A case of allergy to cow's milk hydrolysate. *Allergy* 54(12):1322-6.

Noakes PS, Holt PG, Prescott SL (2003). Maternal smoking in pregnancy alters neonatal cytokine responses. *Allergy* 58:1053-8.

- Noh J, Noh G, Lee SJ, Lee JH, Kim A, Kim HS (2012).** Tolerogenic effect of interferon gamma with induction of allergen-specific interleukin 10 producing regulatory B cell (Br1) changes in non IgE mediated food allergy. *Cellular Immunology* 273:140-149
- Noimark L and Cox HE (2008).** Nutritional problems related to food allergy in childhood. *Pediatr Allergy Immunol* 19: 188-195.
- Novembre E and Vierucci A (2001).** Milk allergy/intolerance and atopic dermatitis in infancy and childhood. *Allergy* 56:Suppl(67):105-108
- Nowak-Wegrzyn A, Assa´ad AH, Bahna SL, Bock SA, Sicherer SH, Teuber SS (2009).** Adverse Reactions to Food Committee of American Academy of Allergy, Asthma & Immunology. Work Group report: oral food challenge testing. *J Allergy Clin Immunol* 123(Suppl):S365-S383.
- Oddy Wh and Rosale F (2010).** A systematic review of the importance of milk TGF- β on immunological outcomes in the infant and young child. *Pediatr Allergy Immunol* 21: 47-59
- Olza J, Porres J, Urbano G, Martínez E and Gil A (2008).** Evaluación biológica de la calidad de una mezcla de proteínas para uso en nutrición enteral. *Nutr Hosp* 23(3): 206-211.
- Osborn DA, Sinn J. (2006)** Formulas containing hydrolyzed protein for prevention of allergy and food intolerance in infants. *Cochrane Database Syst Rev* (4):CD003664
- Pali-Schöll I, Renz H and Jensen-Jarolim E (2009).** Update on allergies in pregnancy, lactation, and early childhood. *J Allergy Clin Immunol* 123:1012-21
- Palmer AC (2011). Nutritionally mediated programming of the developing immune system. *Adv Nutr* 2: 377-395
- Palmer DJ, Sullivan T, Prescott SL, Heddle R, Gibson R, Makrides M (2012).** Effect of n-3 long chain polyunsaturated fatty acid supplementation in pregnancy on infants' allergies in first year of life: randomised controlled trial. *BMJ* 344:e184
- Pedrosa M, Pascual CY, Larco JI, Esteban MM (2006). Palatability of hydrolyzates and other substitution formulas for cow's milk allergic children: a comparative study of taste, smell, and texture evaluated by healthy volunteers. *J Investig Allergol Clin Immunol* 16:351-6.
- Pellegrini A, Dettling C, Thomas U, Hunziker P (2001)** Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine b-lactoglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1526: 131-140
- Penas E, Restani P, Ballabio C, Prestamo G, Fiocchi A, Gomez R (2006).** Evaluation of the residual antigenicity of dairy whey hydrolysates obtained by combination of enzymatic hydrolysis and high-pressure treatment. *J Food Prot.* 69: 1707-1712.
- Penttila IA (2010).** Milk-Derived Transforming Growth Factor- β and the Infant Immune Response. *J Pediatr* 156:S21-5).
- Penttila I (2006).** Effects of transforming growth factor- β and formula feeding on systemic immune responses to dietary beta-lactoglobulin in allergy-prone rats. *Pediatr Res* 59:650-5.
- Pereira L, Pitta M, Virella D and Serala M (2008).** Osmolality of elemental and semi-elemental formulas supplemented with nonprotein energy supplements. *J Hum Nutr Diet*, 21, pp. 584-590
- Piacentini GL, Vicentini L, Bodini A, Mazzi P, Peroni DG, Maffei C, Boner AL (2003).** Allergenicity of a hydrolyzed rice infant formula in a guinea pig model. *Ann Allergy Asthma Immunol* 91(1):61-4.
- Piirainen L, Pesola J, Komulainen J, Vaarala O (2009).** Breastfeeding stimulates total and cows milk-specific salivary IgA in infants. *Pediatr Allergy Immunol* 20: 295-298
- Pistiner M, Gold DR, Abdulkerim H, Hoffman E, Celedon JC (2008).** Birth by caesarean section, allergic rhinitis, and allergic sensitization among children with a parental history of atopy. *J Allergy Clin Immunol* 122:274-9.
- Planas M, Pérez-Portabella C, Martínez C (2010).** Valoración del estado

nutricional en el adulto y en el niño. Cap 3. Tomo 3. Tratado de Nutrición. 2ª Edición.

Plaza Martín AM (2003). Alergia a proteínas de leche de vaca. Protocolos de Inmunología Clínica y Alergología. Capítulo 5. Asociación Española de Pediatría. Sociedad Española de Inmunología Clínica y Alergia Pediátrica. Plaza Martín AM. Protocolos de la AEP. Alergia a las proteínas de leche de vaca. <http://www.aeped.es/protocolos/aler-gia/index.htm>

Prescott SL and Allen KJ (2011). Food allergy: Riding the second wave of the allergy epidemic. *Pediatric Allergy and Immunology* 22: 155–160

Prescott SL, Björkstén B (2007): Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 120: 255–262.

Prescott SL & Calder PC (2004) N-3 polyunsaturated fatty acids and allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7, 123–129.

Prescott SL (2008). Effects of early cigarette smoke exposure on early immune development and respiratory disease. *Paediatr Respir Rev* 9:3–9.

Prescott SL (2011). The influence of early environmental exposures on immune development and subsequent risk of allergic disease. *Allergy* 66 (Suppl. 95) (2011) 4–6

Prescott S and Nowak –Wegrzyn A (2011). Strategies to prevent or reduce allergic disease. *Ann Nutr Metab* 59: 28–42

Quirós, A., Ramos, M., Muguerza, B., Delgado, M. A., Miguel, A., Aleixandre, A., et al. (2006). Identification of novel antihypertensive peptides in milk fermented with *Enterococcus faecalis*. *International Dairy Journal*

Rautava S, Ruuskanen O, Ouwehand A, Salminen S and Isolauri E (2004). The Hygiene Hypothesis of Atopic Disease – An Extended Version. *JPGN* 38_378-388

Recio I, Visser S (1999). Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from

lactoferrin In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A*, 831: 191–201

Reche M, Pascual C, Fiandor A, Polanco I, Rivero-Urgell M, Chifre R, Johnston S and Martín-Esteban M (2010). The effect of a partially hydrolysed formula based on rice protein in the treatment of infants with cow's milk protein allergy *Pediatr Allergy Immunol* 21:577-585

Renz H, Pfefferle PI, Teich R and Garn H (2008). Development and regulation of immune response to food antigens in Pre- and Postnatal life. Nestlé Nutrition Institute Workshop Series Pediatric Program 64:26-27

Renz H, Blumer N, Virna S, Sel S, Garn H (2006). The immunological basis of the hygiene hypothesis. *Chem Immunol Allergy* ;91:30-48.

Restani P, Velona T, Plebani A, Ugazio AG, Poiesi C, Muraro A, Galli CL (1995). Evaluation by SDS-PAGE and immunoblotting of residual antigenicity in hydrolysed protein formulas. *Clin Exp Allergy*. 1995; 25: 651–658.

Restani, P., Gaiaschi, A., Plebani, A., Beretta, B., et al.,(1999). Cross-reactivity between milk proteins from different animal species. *Clin. Exp. Allergy* 29, 997–1004.

Restani P, Beretta B, Fiocchi A, Ballabio C, Galli CL (2002). Cross-reactivity between mammalian proteins. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 89 (6 Suppl 1):11–15.

Restani P, Ballabio C, Cattaneo A, Isoardi P, Terracciano L, Fiocchi A (2004). Characterization of bovine serum albumin epitopes and their role in allergic reactions. *Allergy*. 59 (Suppl 78): 21–24.

Restani P, Ballabio C, Tripodi S, Fiocchi A. (2009). Meat allergy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 9:265–269.

Riedler J, Braun-Fahrlander C, Eder W, Schreuer M, Waser M, Maisch S, et al (2001). Exposure to farming in early life and development of asthma and allergy: a cross-sectional survey. *Lancet* ;358:1129--33.

- Rigotti E, Piacentini GL, Ress M, Pigozzi R, Boner AL, Peroni DG (2006).** Transforming growth factor- β 1 and interleukin-10 in breast milk and development of atopic diseases in infants. *Clinical & Experimental Allergy* 36 (5) 614-618.
- Risé P, Eligini S, Ghezzi S, Colli S, Galli C (2007).** Fatty acid composition of plasma, blood cells and whole blood: Relevance for the assessment of the fatty acid status in humans. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 76: 363-369
- Ritcher WO, Jacob B and Schwandt P (1983).** Molecular weight determination of peptides by high performance gel permeation chromatography. *Analytical Biochemistry* 133:288-291
- Rosendal A. and Barkholt V.(2000).** Detection of Potentially Allergenic Material in 12 Hydrolyzed Milk Formulas. *J Dairy Sci* 83:2200-2210
- Saarinen KM, Sarnesto A, Savilahti E (2002). Markers of inflammation in the feces of infants with cow's milk allergy. *Pediatr Allergy Immunol* 13:188-194
- Sala-Vila A, Miles E.A and Calder P (2008).** Fatty acid composition abnormalities in atopic disease: evidence explored and role in the disease process examined. *Clinical and Experimental Allergy*, 38, 1432-1450
- Sampson HA and Anderson JA (2000).** Summary and recommendations: Classification of gastrointestinal manifestation due to immunologic reactions to food in infants and young children. *JPGN* 30:S87-94.
- Sampson HA (2004).** Update in food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 113:805-819
- Sanz Ceballos, Sanz Sampelayo MR, Gil Extremera F and Rodríguez Osorio M (2009).** Evaluation of the allergenicity of goat milk, cow milk, and their lactosera in a guinea pig model. *J. Dairy Sci.* 92:837-846
- Sausenthaler S, Koletzko S, Schaaf B, Lehmann I, Borte M, Herbarth O, et al (2007).** Maternal diet during pregnancy in relation to eczema and allergic sensitization in the offspring at 2 y of age. *Am J Clin Nutr* 85:530-7.
- Savilahti EM, Kukkonen AK, Aahtela T, Kuitunen M, Savilahti E (2011).** Children who develop allergy have low fecal alpha-defensin levels but high beta-defensin levels in infancy. Oral communication. Food Allergy Anaphylaxis Meeting (Venice). O32 Abstract.
- Savilahti EM, Rantanen V, Lin JS, Karinen S, Saarinen KM, Goldis M et al (2010).** Early recovery from cow's milk allergy is associated with decreasing IgE and increasing IgG4 binding to cow's milk epitopes. *J Allergy Clin Immunol* 125:1315-21
- Savino F, Castagno E, Monti G, Serraino P, Peltran A, Oggero R, Fanaro S, Vigi V, Silvestro L. (2005).** Z-score of weight for age of infants with atopic dermatitis and cows milk allergy fed with a rice-hydrolyzed formula during the first two years of life. *Acta Paediatr* 94:115-9.
- Scalabrin DM, Johnson WH, Hoffman DR, P'Pool VL, Harris CL, Mitmesser SH (2009).** Growth and Tolerance of Healthy Term Infants Receiving Hydrolyzed Infant Formulas Supplemented With *Lactobacillus rhamnosus* GG: Randomized, Double-Blind, Controlled Trial. *Clin Pediatr* 48: 734
- Schernhammer ES, Vutuc C, Waldhor, Haidinger G. (2008)** Time trends of the prevalence of asthma and allergic disease in Austria children. *Pediatr Allergy Immunol* 19:125-31.
- Schade RP, Ieperen-Van Dijk AG, Kimpfen JL, Knol EF et al (2000).** Differences in antigen specific T-cell responses between infants with atopic dermatitis with and without cow's milk allergy; relevance of Th2 cytokines. *J Allergy Clin Immunol* 106;1155-62
- Schaub B, Liu J, Hoppler S, Schleich I, Huehn J, Olek S et al (2009).** Maternal farm exposure modulates neonatal immune mechanisms through regulatory T cells. *J Allergy Clin Immunol* 123:774-782.
- Schwartz J, Drossard C, Dube K, Kannenberg F, Junz C, Kalhoff H, Kersting M (2010).** Dietary intake and plasma concentrations of PUFA and LC-PUFA in breastfed and formula fed infants

under real life conditions. *Eur J Nutr* 49:189-195

Scientific Committee on Food (1993). Report on infant formulae claimed to be hypoallergenic or hypoantigenic. http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/reports/scf_reports_28.pdf

Scientific Committee on Food (2003). Report of the Scientific Committee on Food on the Revision of Essential Requirements of Infant Formulae and Follow-on Formulae. SCF/CS/NUT/IF/65 Final

Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from Mead Johnson Nutritionals on DHA and ARA and visual development. *The EFSA Journal* (2009) 941: 1-14
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/941.pdf>

Searing DA and Leung DYM (2010). Vitamin D in Atopic Dermatitis, Asthma and Allergic Diseases. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 30(3) 397-409.

Seppo L, Korpela R, Lönerdal B, Metsäniitty L, Juntunembackman K, Klemola T et al (2005). A follow-up study of nutrient intake, nutritional status and growth in infant with cow's milk allergy fed either a soy formula or extensively hydrolysed whey formula. *Am J Clin Nutr* 82:140-5

Section on Breastfeeding, AAP (2012): Breast and the use of human milk. *Pediatrics* 2012: 129;e827;

Sicherer SH, Eigenemann PA, Sampson HA (1998). Clinical features of food-protein-induced enterocolitis syndrome. *J Pediatr* 133:214-9

Sicherer SH, Teuber S and the Adverse Reactions to Food Committee (2004). Current approach to the diagnosis and management of adverse reaction to foods. AAAAI Practice Paper. *J Allergy Clin Immunol* 114: 1146-50

Sierra S, Lara-Villoslada F, Olivares M, Jiménez J, Boza J, Xaus J (2004). La expresión de IL-10 interviene en la regulación de la respuesta inflamatoria por los ácidos grasos omega 3. *Nutr Hosp* 19: 376-384

Skoog/Leary. Análisis Instrumental. Cuarta Edición. Mc Graw Hill.

Skripak JM, Matsui EC, Mudd K, Wood RA (2007). The natural history of IgE-mediated cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol*;120:1172-7

Soares K, Panesar S, Rader T, Takwoingi Y, Werfel T, Muraro A et al. (2013). The diagnosis of food allergy: protocol for a systematic review. *Clinical and Translational Allergy* 3:18.

Sociedad Española de Alergología e Inmunología Clínica (SEAIC) (2004). Alergia a alimentos. Monografía elaborada por Comité de Reacciones Adversas a Alimentos, SEAIC. Depósito Legal: B. 8.052-2004. ISBN: 84-931353-2-1

Spiekermann GM and Walker WA (2001). Oral Tolerance and Its Role in Clinical Disease. *JPGN* 32:237-255

Staden U, Rolinck-Werninghaus C, Brewe F, Wahn U, Niggemann B and Beyer K (2007). Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy* 62: 1261-1269

Stone KD, Prussin C and Metcalfe DD (2010). IgE, mast cells, basophils and eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 125:S73-80.

Strachan DP (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 299:1259-60.

Szajewska H and Horvath A (2009). Meta-analysis of the evidence for a partially hydrolyzed 100% whey formula for the prevention of allergic diseases. *CMRO* 26(2): 423-437

Terraciano G, Bouygue R, Sarratud T, Veglia F, Martelli A and Fiocchi A (2010). Impact of dietary regimen on the duration of cow's milk allergy: a random allocation study. *Clinical & Experimental Allergy*, 40, 637-642

Thang C, Boye J, Shi H, Zhao X (2013). Effects of supplementing different ratios of omega-3 and omega-6 fatty acids in western-style diets on cow's milk protein allergy in a mouse model. *Mol. Nutr. Food Res.* 00: 1-10

- Thornton CA and Morgan G (2008).** Innate and Adaptive Immune Pathways to Tolerance. Nestlé Nutrition Institute Workshop Series Pediatric Program 64:10-11
- Tiemessen MM, Van-leperen AG, Bruijnzeel CA, Garssen J (2004).** Cow's milk specific T-cell reactivity of children with and without persistent cow's milk allergy: Key role for IL-10. *J Allergy Clin Immunol* 113:932-9.
- Tormo R y Martín J (2010).** Alergia e intolerancia a la proteína de la leche de vaca. Protocolos diagnósticos y terapéuticos en pediatría; 11-17. <http://aeped/protocolos/alergia>
- Torres J, Moreno G, Molina AB (2012).** Diet for the prevention of asthma and allergies in early childhood: Much ado about something? *Allergol Immunopathol* 40:244-52
- Tsopmo, A., Romanowski, A., Banda, L., Lavoie, J. C., Jenssen, H., & Friel, J. K. (2011).** Novel anti-oxidative peptides from enzymatic digestion of human milk. *Food Chemistry*, 126(3), 1138-1143.
- Uauy R and Dangour AD (2009).** Fat and Fatty Acid Requirements and Recommendations for Infants of 0-2 Years and Children of 2-18 Years. *Ann Nutr Metab* 2009;55:76-96
- Undurti DA (2006).** Can perinatal supplementation of long-chain polyunsaturated fatty acids prevent atopy, bronchial asthma and other inflammatory conditions? *Med Sci Monit*, 2006; 12(6): RA99-111
- Vandenplas Y, Brueton M, Dupont C, Hill D, Isolauri E, Koletzko S, Orange A and Staiano A (2007).** Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Arch. Dis. Child.* 92;902-908
- Vandenplas Y, Hauser B, Blecker U, Suys B, Peeters S, Keymolen K, Loeb H (1993).** The nutritional value of a whey hydrolysate formula compared with a whey predominant formula in healthy infants. *JPGM* 17:92-96
- W**
- van Esch E, Knipping K, Jeurink P, van der Heide S, Dubois A, Willemsen L, Garssen J, Knippels L (2011).** In vivo and in vitro evaluation of the residual allergenicity of partially hydrolysed infant formulas. *Toxicology Letters* 201: 264-269
- Van Esch E, van Bilsen J, Jeurink P, Garssen J, Penninks A, Smit J, Pieters R, Knippels L (2013).** Interlaboratory evaluation of a cow's milk allergy mouse model to assess the allergenicity of hydrolysed cow's milk based infant formulas *Toxicology Letters* 220:95-102
- Vasallo MF and Camargo CA (2010).** Potential mechanisms for the hypothesized link between sunshine, vitamin D, and food allergy in children. *J Allergy Clin Immunol* 126:217-22.
- Vita D, Passalacqua G, Di Pasquale G, Caminiti L, Crisafulli G, Rulli I. (2007).** Ass's milk in children with atopic dermatitis and cow's milk allergy: crossover comparison with goat's milk. *Pediatr Allergy Immunol.*18: 594-598.
- Von Berg A, Filippiak-Pittruff B, Kramer U, Link E, Bollrath C, Brockow I et al. (2008).** Preventive effect of hydrolyzed infant formulas persists until age 6 years: Long-term results from the German Infant. Nutritional Intervention Study (GINI). *J Allergy Clin Immunol* 121:1442-7
- von Berg, A., Filipiak-Pittroff, B., Krämer, U., Hoffmann, B., Link, E., Beckmann, C., Hoffmann, U., et al. (2013).** Allergies in high-risk schoolchildren after early intervention with cow's milk protein hydrolysates: 10-year results from the German Infant Nutritional Intervention (GINI) study. *J Allergy Clin Immunol* 131(6): 1565-1573.
- Von-der-weid T, Bulliard T, Fritsche R. (2001).** Suppression of specific and bystander IgE responses in a mouse model of oral sensitization to b-lactoglobulin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 125, 307-315
- Wahn HU (2008).** Strategies for Atopy Prevention. *J. Nutr.* 138: 1770S-1772S
- Wal JM (2004).** Bovine milk allergenicity. *Ann Allergy Asthma Immunol* 5(3) S2-11
- World Allergy Organization (2011).** White Book on Allergy. ISBN-10 0615461824 ES

Wang YH and Liu YJ (2008). The IL-17 cytokine family and their role in allergic inflammation. *Current Opinion in Immunology* 2008, 20:697-702

Werfel SJ, Cooke SK and Sampson HA (1997). Clinical reactivity to beef in children allergic to cow's milk. *J Allergy Clin Immunol* 99: 293-300

World Health Organization WHO (2006). WHO Child Growth Standards Length/height-for-age, weight-for-age, weight-for-length, weight-for-height and body mass index-for-age. Methods and development.
http://www.who.int/childgrowth/standards/Technical_report.pdf

Willers SM, Devereux G, Craig LC, McNeill G, Wijga AH, Abou El-Magd W et al (2007). Maternal food consumption during pregnancy and asthma, respiratory and atopic symptoms in 5-year-old children. *Thorax*;62:772-8.

Witte TR, Salazar AJ, Ballester OF, Hardman WE (2010). RBC and WBC fatty acid composition following consumption of an omega 3 supplement: lessons for future clinical trials. *Lipids Health Dis* 2010; 9:31.

Yamamoto, N., A. Akino, and T. Takano (1994). Antihypertensive effect of peptides from casein by an extracellular protease from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* 77:917-922.

Yu JW, Pেকেles G, Legault L, McCusker CT (2006) Milk allergy and vitamin D deficiency rickets: a common disorder associated with an uncommon disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 96(4): 615-619.

Zeiger RS (2003). Food Allergen Avoidance in the Prevention of Food Allergy in Infants and children. *Pediatrics* 111;1662-1671

Ziegler EE and Fomon SJ (1989). Potential Renal Solute Load of Infant Formulas. *J. Nutr.* 119: 1785-1788, 1989.

Zutavern, A., Brockow, I., Schaaf, B., von Berg, A., Diez, U., Borte, M., Kraemer, U., et al. (2008). Timing of solid food introduction in relation to eczema, asthma, allergic rhinitis, and food and inhalant sensitization at the age of 6 years: results from the prospective birth cohort study LISA. *Pediatrics* 121(1):e44-52.

