

## ALERGIAS ALIMENTARIAS Y LA INFLUENCIA DE LOS MÉTODOS DE PROCESADO

### FOOD ALLERGIES AND THE INFLUENCE OF PROCESSING METHODS

WILMAN CARRILLO

Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC-UAM) Madrid- España.

#### Resumen

La incidencia de alergias alimentarias en los países desarrollados se estima que puede ser de un 3-4% en adultos y de un 6-8% en niños y sigue aumentando rápidamente. Los alérgenos alimentarios son principalmente proteínas que causan una respuesta inmune mediada por IgE, pero el mecanismo de esta respuesta todavía no es claro.

La alergia al huevo es una causa frecuente de hipersensibilidad durante la niñez. La resistencia a la digestión es un criterio usado en los ensayos de alergenidad de una proteína. En adición, es necesario tener en cuenta el efecto sobre las proteínas de los tratamientos comúnmente aplicados a los alimentos. Estos tratamientos pueden modificar la estructura de la proteína, cambiando su digestibilidad y alterando su alergenidad.

**Palabras claves:** Alergias alimentarias, alérgenos, epítopos, inmunoglobulinas, alergenidad.

English

#### FOOD ALLERGIES AND THE INFLUENCE OF PROCESSING METHODS

##### SUMMARY

*The incidence of food allergy in developed countries is estimated to be 3-4% in adults and up to 6-8% in children, and it seems to be rising rapidly. Food allergens are mainly proteins that cause an IgE-mediated immune response, but the mechanism for this response still remains unclear.*

*Egg allergy is a common cause of hypersensitivity in children. The resistance to digestion is one of the criteria used to assess the allergenicity of a protein. In addition, it is necessary to take into account the effect on proteins of the treatments that are commonly applied to foods. These treatments can modify the protein structure, changing the digestibility of the protein and thus altering its allergenicity.*

**Key words:** Food allergies, allergens, epitopes, immunoglobulins, allergenicity.

Português

#### ALERGIAS ALIMENTARES E A INFLUÊNCIA DOS MÉTODOS DE PROCESSAMENTO

##### RESUMO

*Estima-se que a incidência de alergias alimentares nos países desenvolvidos pode ser 3-4% em adultos e 6-8% em crianças e continua aumentando rapidamente. Os alérgenos alimentares são principalmente as proteínas que causam uma resposta imune mediado por IgE, mas o mecanismo desta resposta ainda não é claro.*

*A alergia ao ovo é uma causa frequente da hipersensibilidade durante a infância. A resistência à digestão é um critério usado nos ensaios de alergenidade de uma proteína. Além disso, é preciso ter em conta o efeito sobre as proteínas dos tratamentos normalmente aplicados aos alimentos. Estes tratamentos podem modificar a estrutura da proteína, alterando a sua digestibilidade e modificando a sua alergenidade.*

**Palavras-chave:** Alergias alimentares, alérgenos, epítopos, imunoglobulinas, alergenidade

## Introducción

Cerca del 20% de la población altera su dieta por reacciones adversas a alimentos. Dentro de estas reacciones encontramos las alergias, desordenes metabólicos (por ejemplo la intolerancia a la lactosa) y respuestas a componentes de alimentos que pueden ser farmacológicamente activos (cafeína) y tóxicos (venenos).<sup>1</sup>

El término de hipersensibilidad alimentaria se refiere a todas aquellas reacciones individuales y adversas del organismo a determinados alimentos. Las proteínas son la principal causa de estas reacciones; otras moléculas como los polisacáridos, también pueden provocar reacciones aunque suelen ser más leves y menos frecuentes. Si en la respuesta del organismo está implicado el sistema inmunológico entonces la hipersensibilidad se denomina alergia alimentaria.<sup>1,2</sup> Las alergias alimentarias son mediadas por anticuerpos denominados inmunoglobulinas E (IgE) y son clasificadas como reacciones de hipersensibilidad tipo I.<sup>3</sup>

La incidencia de alergias alimentarias en países desarrollados suele ser de un 3-4 % en adultos y de un 6-8% en niños.<sup>4,5</sup> Se estima que en los Estados Unidos mueren cerca de 125-150 personas al año por anafilaxis por alergias alimentarias.<sup>6</sup> En los niños las causas más comunes de alergias alimentarias son la leche de vaca (2.5%), seguida del huevo (1.3%), cacahuets (0.8%), cereales (0.4%), soja (0.4%), frutos secos (0.2%), mariscos (0.1%) y pescado (0.1%). Las alergias a la leche de vaca, huevo y cereales generalmente desaparecen en la edad escolar (aproximadamente el 80%). Mientras que las alergias a los cacahuets y frutos secos son consideradas permanentes, cerca del 20% de niños con alergias a cacahuets experimentan una pérdida de la alergia alrededor de los cinco años (es posible que vuelva a parecer). Las alergias más comunes en adultos son a mariscos (2%), cacahuets (0.6%), frutos secos (0.5%) y pescado (0.4%). Reacciones a frutas y vegetales también son comunes pero son menos severas.

Se ha descrito que en la pasada década se incrementó dos veces la prevalencia de las alergias alimentarias y continúa creciendo convirtiéndose en un problema importante de salud.

El huevo es un alimento que aporta un porcentaje considerable de proteínas y vitamina B12, es barato y de fácil producción. Se introduce en la dieta alrededor de los dos años. Es uno de los alimentos con múltiples proteínas alergénicas. Los principales alérgenos del huevo se encuentran en la clara y son: ovomucoide (Gal d 1, 28 KDa, 11%), ovoalbúmina (Gal d 2, 44 KDa, 54%), ovotransferrina (Gal d 3, 78 KDa 3.5%) y la lisozima (Gal d 4, 14 KDa, 3.5%). La yema es menos alergénica (aproximadamente dos tercios de los niños alérgicos al huevo lo son a la clara), siendo la principal proteína implicada la  $\alpha$ -livetina.<sup>7</sup> Mundialmente la pre-

valencia de las alergias al huevo se estima que puede llegar a ser entre 1.6- 3.2 % en los países desarrollados y es la segunda causa de alergias alimentarias en niños en los Estados Unidos.<sup>8</sup> Estudios epidemiológicos recientes sugieren que el mayor nivel de higiene en las poblaciones urbanas de los países desarrollados puede jugar un papel importante en el desarrollo de las alergias.<sup>9</sup>

## Mecanismo de las alergias alimentarias

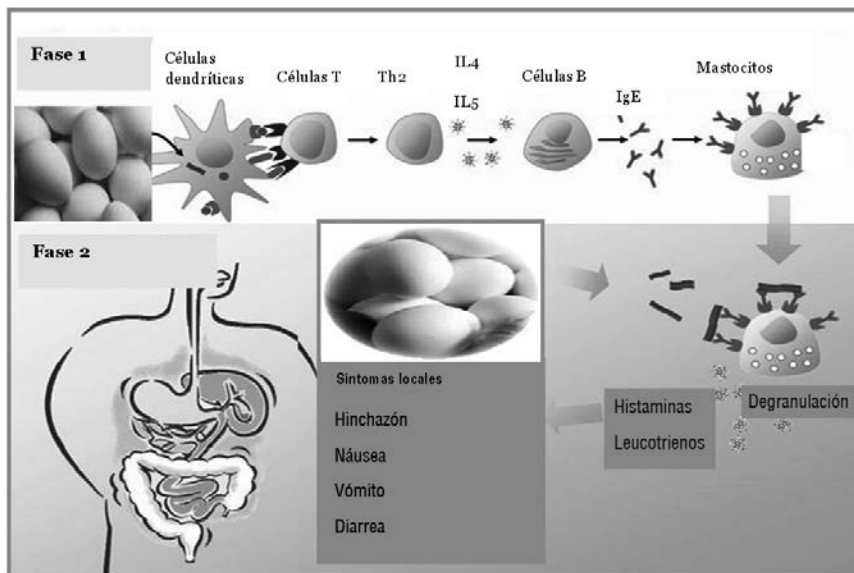
Las reacciones de hipersensibilidad inmediata, también llamadas alergias de tipo I, están mediadas por inmunoglobulinas (IgE). Las IgE constituyen uno de los cinco tipos de anticuerpos que genera el cuerpo humano y por lo general, están implicadas en la defensa contra infecciones parasitarias. Las reacciones alérgicas a los alimentos ocurren generalmente en individuos atópicos (personas genéticamente predispuestas a tener síntomas de alergias) y que han sido previamente sensibilizados a la proteína alergénica.

El desarrollo de una alergia es un proceso múltiple en el que están implicados numerosos factores que han sido descritos ampliamente.<sup>10</sup> Sin embargo, los mecanismos que conducen a la sensibilización, producción de anticuerpos IgE y desarrollo de la enfermedad son complejos y no del todo claros. Un esquema del mecanismo de las alergias mediadas por IgE se muestra en la Figura 1. Inicialmente tiene lugar una fase de sensibilización, durante la cual el alérgeno estimula la producción de anticuerpos IgE específicos. Los alérgenos atraviesan la mucosa intestinal y son procesados por las células presentadoras de antígenos (células dendríticas, macrófagos, etcétera) que los presentan a los linfocitos T CD4+ , dando lugar a los linfocitos T helper (Th). Por razones todavía desconocidas se produce una respuesta Th2, en lugar de una respuesta Th1 y la liberación de factores solubles, como las interleucinas IL-4-5 y 13, que inducen la proliferación y diferenciación de las células B especializadas en la producción de IgE.<sup>11</sup>

Los anticuerpos IgE se unen a los mastocitos de los tejidos y a los basófilos de la sangre, que contienen gránulos con compuestos fisiológicamente activos. En una nueva exposición al alérgeno, se produce la segunda fase de la alergia, reacción alérgica. El alérgeno interacciona con dos anticuerpos IgE en la superficie de estas células, estimulando la liberación de sustancias mediadoras de la reacción alérgica a los tejidos y sangre. Entre ellas, la histamina es uno de los mediadores primarios, aunque hay muchas otras, como leucotrienos y prostaglandinas, responsables de síntomas más avanzados.<sup>12</sup>

FIGURA 1

**Mecanismo de las alergias**



**Características de los alérgenos alimentarios**

La mayoría de los alérgenos alimentarios de tipo I, son glicoproteínas solubles en agua con tamaños moleculares comprendidos entre 10 a 70 KDa que son estables al calor, a los ácidos y a las enzimas proteolíticas, por ejemplo, las proteínas de la leche (caseínas), los cacahuets (vicilinas) y el huevo (ovomucoide). Pero no parece haber ningún indicador que permita predecir con seguridad la alergenicidad de las proteínas.<sup>13</sup>

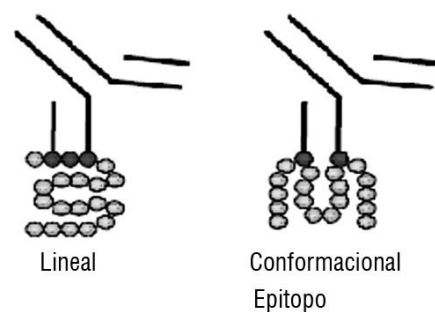
Sólo algunas regiones de las proteínas son reconocidas por el sistema inmunológico, bien por las células B, los anticuerpos IgE que producen o por las células T, también implicadas en el proceso. Tales regiones se denominan epítopos y pueden ser lineales (secuencias ininterrumpidas de aminoácidos) o conformacionales (secuencias discontinuas reconocidas debido a la estructura tridimensional) [Figura 2]. Dado que todos los alérgenos deben ser capaces de hacer puente entre moléculas de IgE para causar la degranulación, han de contener al menos dos epítopos reactivos hacia dichos anticuerpos. Los epítopos lineales se estudian mediante análisis de hidrolizados (obtenidos con proteasas o con bromuro de cianógeno), o de péptidos sintéticos, y de su capacidad de unión a la IgE específica y las células T. La importancia de la estructura tridimensional de las proteínas en su inmunogenicidad radica en que constituye el origen de los epítopos conformacionales que se estudian mediante la unión de anticuerpo monoclonales, capaces de reconocer regiones específicas, e incluso mediante mutagénesis sitio-dirigida.

Los epítopos conformacionales son en principio fáciles

de eliminar, por desnaturalización de la proteína o hidrólisis parcial. Sin embargo, los epítopos lineales pueden presentar mayor dificultad para su eliminación, sobre todo si se localizan en regiones de la proteína muy hidrófobas y difícilmente accesibles a las enzimas proteolíticas.

FIGURA 2

**Estructura de los epítopos lineales y conformacionales**



**Alergias y los aditivos alimentarios**

Muchos compuestos químicos son utilizados en la industria alimentaria como conservantes alimentarios porque ayudan a prevenir la alteración y degradación de los alimentos por los microorganismos; entre estas moléculas se encuentran el ácido sórbico, el ácido benzoico, propionato sódico, dióxido de azufre, sulfitos y bisulfitos, etcétera. Muchos productos derivados del huevo también son utilizados para estos fines,

entre ellos se encuentra la lisozima de clara de huevo de gallina, la cual está catalogada y aceptada como aditivo alimentario en muchos países, por sus propiedades antibacterianas. Por ejemplo en la Unión Europea está permitido su uso para la fabricación de quesos, (Directiva europea Nº 95/2/EC), en la que se establece que se puede utilizar entre 50 y 350 mg de lisozima por kg de queso. La adición excesiva de estos conservantes en los alimentos puede conducir a reacciones alérgicas especialmente en personas ya sensibilizadas. Cantidades comprendidas entre 1 y 2 mg de lisozima de huevo pueden producir reacciones en personas muy sensibles. Los alérgenos ocultos son un problema común en la seguridad alimentaria que se conoce desde hace muchos años, además esto puede estar contribuyendo a la prevalencia de las alergias alimentarias.

Un alimento además de ser nutritivo tiene que ser seguro, por ello es importante que los fabricantes etiqueten correctamente los productos, indicando si contienen alérgenos alimentarios. La Unión Europea en su Directiva 2003/89/EC establece un listado de aditivos alimentarios que deben ser declarados, entre los que se encuentran los productos derivados del huevo. En esta directiva se indica que se deben declarar correctamente en el etiquetado los alérgenos que contenga el alimento, además de informar si en su fabricación se utilizan o se comparten maquinaria para la fabricación de otros productos. Entre los alimentos sobre los que se quiere aplicar esta directiva se encuentran los vinos, ya que en su fabricación se utiliza la lisozima de clara de huevo, pero hay un rechazo generalizado en esta industria a declarar la lisozima en el etiquetado.

### **Métodos de procesado y su influencia en la alergenicidad de las proteínas alimentaria**

Cualquier proceso que modifique la estructura de una proteína puede ser capaz de interferir en la capacidad de unión frente a los anticuerpos. Los procesados alimentarios inducen ciertos cambios físicos, químicos y bioquímicos de los cuales se sabe que pueden afectar el potencial alergénico de las proteínas. Algunos métodos pueden aumentar, disminuir o eliminar el potencial alergénico de un alimento. Este impacto se ve afectado por la naturaleza del procesado alimentario usado (calor, pH, enzimas proteolíticas, presencia de agua, lípidos, atmósfera gaseosa, concentración de las proteínas, etc.), el tiempo durante el que se aplique y la intensidad misma del procesado.

Estos procesados pueden agruparse en dos categorías: procesados térmicos y procesados no térmicos (químicos, bioquímicos y procesos mecánicos).

### **Procesados térmicos**

En general los tratamientos térmicos se ha visto que reducen significativamente la reactividad frente a IgE de algunos alérgenos muy bien conocidos, como resultado de mecanismos de desdoblamiento.<sup>14</sup> El horneado, cocinado, asados, secado, la pasteurización, esterilización, desnaturalización (por desdoblamiento y/o agregación) y la reacción con otras moléculas de la matriz del alimento durante el tratamiento térmico producen modificaciones en el potencial alergénico de las proteínas. La alteración de proteínas lábiles al calor puede llevar a la pérdida de epítomos conformacionales, jugando un papel muy importante en la pérdida de la alergenicidad de estas proteínas. Por ejemplo la proteína Bev 1 (proteína de manzana) se sabe que contiene epítomos conformacionales, después de tratarla térmicamente se destruyen los epítomos conformacionales y con ello se pierde su alergenicidad. Por otro lado, la proteína Glym 4 la cual es homóloga de Bev 1 retiene su alergenicidad en alimentos de soja procesados térmicamente. Dependiendo de la severidad del tratamiento, una parte de la proteína puede retener su forma nativa, esto puede ser suficiente para ser reactiva frente a la IgE. Además, la estructura reomórfica de muchas proteínas puede prevenir la alteración de su capacidad de unión a la IgE después del tratamiento térmico.

Los mecanismos de agregación inducen la formación de puentes disulfuro, que pueden alterar la capacidad de unión a las IgE. Está demostrado que la  $\beta$ -lactoglobulina por calentamiento se une a otras proteínas presentes en el alimento por formación de puentes disulfuro, afectando su alergenicidad.

Entre los alérgenos de origen animal, los presentes en el huevo se caracterizan por su estabilidad a los tratamientos térmicos, aunque se ha observado que el calentamiento de la clara de huevo a 90°C durante 60 minutos disminuye en un 55% las reacciones positivas tras pruebas de doble ciego en pacientes con respuesta positiva frente a la clara liofilizada, lo que podría deberse a la destrucción de los epítomos conformacionales tras el tratamiento térmico. El calentamiento a 95°C durante 15 minutos, disminuye la unión a la IgE de la ovoalbúmina y el ovomucoide, pero no afecta a la lisozima.<sup>15</sup> La digestión de la ovoalbúmina se ve favorecida cuando previamente se trata con calor a 100°C durante 5 minutos.<sup>16</sup> La desnaturalización térmica puede llegar favorecer la digestión enzimática de ciertas proteínas. Por ejemplo la  $\beta$  lactoglobulina, una proteína resistente a la digestión enzimática, se observó un aumento en su grado de hidrólisis cuando fue previamente calentada.<sup>17</sup> Ese aumento en la digestibilidad en algunos casos puede llegar a disminuir o no la alergenicidad.

Recientemente, en el estudio de estructuras de prote-

ínas envueltas en matrices complejas como la leche, se han utilizado técnicas inmunoquímicas para determinar diferencias en sus estructuras. Las técnicas inmunoquímicas fueron utilizadas para distinguir entre la forma nativa y desnaturalizada de la  $\alpha$ -lactoalbúmina ( $\alpha$  La) en la leche. El tratamiento térmico como la ultra alta temperatura (UHT) o esterilización, permite que ciertos epítomos desaparezcan cuando aumenta la temperatura, mientras que nuevos epítomos aparecen gradualmente.<sup>18,19</sup>

### Procesados no térmicos

Otros tratamientos de procesamiento alimentario pueden afectar el potencial alergénico de algunos productos alimentarios. Cambios en el pH y ciertos tratamientos químicos pueden afectar las propiedades de las proteínas por modificación específica de uno o más aminoácidos. Por ejemplo, tratamientos ácidos destruyen la glutamina y la asparagina, mientras que tratamientos alcalinos destruyen las cisteínas, serinas y treoninas. Otros tratamientos químicos como la acilación, glicosilación, fosforilación, etcétera, sirven para mejorar las propiedades funcionales de las proteínas pero también pueden tener un efecto negativo como residuos químicos o posibles cambios en la secuencia de aminoácidos. El tratamiento con altas presiones es un proceso no térmico, que puede afectar las propiedades de las proteínas; se ha visto que la antigenicidad de las proteínas de suero se ve disminuida cuando es tratada con altas presiones.<sup>20</sup>

La hidrólisis enzimática es el procesamiento más eficiente para destruir epítomos secuenciales y conformacionales, siendo la mejor forma de reducir la alergenicidad de las proteínas. La proteólisis depende no sólo de la secuencia de aminoácidos de la proteína, también son importantes su forma estructural secundaria (presencia de puentes disulfuro) y las modificaciones postrasionales (glicosilación).

Las enzimas tripsina y quimotripsina se utilizan para producir fórmulas infantiles hipoalergénicas de la leche de vaca. La ultrafiltración de fórmulas infantiles hipoalergénicas basadas en tratamientos enzimáticos de la leche con proteasas permite remover el remanente de proteínas intactas y eliminar su alergenicidad de la leche.

Algunas veces los tratamientos enzimáticos no destruyen todos los epítomos produciendo una hidrólisis incompleta, con fragmentos péptidicos alergénicos en algunos casos mucho más activos que la proteína paterna. Los péptidos también pueden re-asociarse para formar agregados que pueden incrementar el potencial alergénico de los alimentos.

### Efecto de la digestión en la alergenicidad de proteínas alimentarias

El proceso de la digestión juega un papel importante en la sensibilización alérgica. Para que se dé una reacción alérgica es necesaria la exposición previa del sistema inmune con la proteína. Saber que le sucede a los alérgenos alimentarios en el tracto gastrointestinal (fragmentación, absorción, biodisponibilidad y conjugación con otras proteínas) es importante para el conocimiento de las alergias. El desarrollo de modelos *in vitro* que simulan las condiciones de la digestión *in vivo* es limitado. Dos tipos de modelos *in vitro* son utilizados en la investigación y son modelos estáticos y dinámicos. Los modelos estáticos (modelos bioquímicos), que no simulan las condiciones físicas de una digestión *in vivo*. Los modelos dinámicos se caracterizan porque tratan de simular las condiciones físicas que ocurren *in vivo* (como hidratación, mezclado, etcétera). Estos modelos usan alimentos complejos y tiene en cuenta los efectos de la matriz del alimento en la cinética de la liberación del alérgeno. Un modelo dinámico descrito en la literatura es el modelo intestinal descrito por Moreno y col., (2005).<sup>21</sup> Este modelo analiza cómo afecta la estructura del alimento en la liberación de alérgenos en el tracto gastrointestinal, su estabilidad y su degradación en el lumen intestinal. También es importante tener en cuenta las interacciones de las proteínas con otros componentes. Las asociaciones lípido proteína podrían ejercer un efecto protector frente a la digestión, puesto que la adsorción de la proteína en la interfase aceite/agua origina cambios conformacionales que hacen que algunos enlaces susceptibles no sean accesibles al ataque enzimático. El grupo de Mills encontró que el surfactante biológico fosfatidilcolina (secretado por el estómago y también presente en las sales biliares) interfiere con la degradación del alérgeno  $\beta$ -lactoglobulina. Además hay que tener en cuenta que un 30% de los lípidos de la yema de huevo son fosfolípidos, de los cuales un 80% es fosfatidilcolina.<sup>22</sup>

Las alteraciones en la absorción de la proteína (biodisponibilidad) se sabe que afectan mucho el potencial alergénico de las proteínas. Por ejemplo, la reducción de la acidez gástrica por inhibidores de la bomba de protones afecta de manera importante a la alergenicidad de la proteína por que permite la absorción de fragmentos más largos y más activos inmunológicamente. Muchos factores pueden afectar la permeabilidad epitelial, y promover la presentación de antígenos en el sistema inmune de la mucosa intestinal. Dentro de estos se incluye el estrés crónico psicológico. También la presencia de surfactantes exógenos en los alimentos puede inducir la degranulación de mastocitos e inducir una reorganización del citoesqueleto de enterocitos que permiten la penetración excesiva de

proteínas. En forma similar, la ingesta de alcohol puede permitir la penetración excesiva de proteínas. Un gran número de alérgenos alimentarios son estables en condiciones que simulan la digestión gastrointestinal *in vivo*. Entre estas proteínas no hay características comunes, aunque se asume que tienden a ser proteínas mayoritarias en los alimentos, resistentes a la digestión y estables a los tratamientos de procesamiento sobre todo al tratamiento térmico.<sup>23</sup>

### Digestión gástrica *in vitro* en SGF y su influencia en la alergenicidad de proteínas alimentarias

Los ensayos de digestión *in vitro* con pepsina en un principio fueron desarrollados y utilizados para evaluar el valor nutricional de las proteínas como fuentes de aminoácidos viables.<sup>24,25</sup> Posteriormente los avances de la tecnología recombinante permitieron usar la pepsina y otras proteasas para identificar los segmentos de las proteínas que se unen a las inmunoglobulinas (IgE).<sup>26,27</sup>

Astwood y col., (1996) fueron los primeros en reportar la aplicación de un ensayo de digestión *in vitro* con pepsina para evaluar la alergenicidad de proteínas alimentarias. En ese estudio se comparó la digestibilidad de proteínas alergénicas frente a proteínas no alergénicas, en SGF (Fluido Gástrico Simulado consistente de 0,035 M NaCl a pH 1.2 con pepsina según la US Pharmacopoeia, 1995). Muchos de esos alérgenos fue-

ron estables durante 60 minutos de digestión o formaron fragmentos estables, mientras que las proteínas no alergénicas fueron digeridas rápidamente, sin formar fragmentos peptídicos estables. En este estudio se concluyó que los alérgenos pueden ser más estables a la digestión que las proteínas que no eran alergénicas, proponiéndose que la digestión puede ser un parámetro eficaz para distinguir alérgenos de proteína no alergénicas (Astwood y col., 1996).<sup>28</sup> Otros estudios realizados con diferentes proteínas apoyan esta afirmación.<sup>29,30,31,32,33</sup>

Sin embargo, otros trabajos proponen que la resistencia a la digestión por pepsina no puede utilizarse como un método para predecir la alergenicidad, ya que ciertas proteínas alergénicas son hidrolizadas con facilidad en SGF.<sup>22,29,34</sup>

Esta contradicción en estos estudios sobre la medida de la alergenicidad usando ensayos con pepsina en parte puede deberse a la falta de estandarización de los protocolos para la digestión de proteínas en SGF. Estas variaciones pueden ser diferencias en el pH del ensayo, la pureza de la pepsina, la relación enzima/sustrato, la pureza de la proteína y su estructura, diversos métodos de procesamiento a los que se someten los alimentos (tratamientos térmicos) y, por último, el método de detección.<sup>22</sup> También se deben tener en cuenta las diferencias de digestión de estas proteínas de huevo que existen entre adultos y niños.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- López-Fandiño, R: Alergias e intolerancias Alimentarias. En: Alimentación y Nutrición. (Modulo II). Ed. Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos. Acción Médica, S.A. Madrid, España. 2006. pp: 149-172.
- 2- Johansson, S.G.O., Bieber, T., Friedman, PS: Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Review Committee of the world Allergy Organization. *J. Allergy Clin. Immunol*, 2004, 113: 832-836.
- 3- Ebo, D.G and Steven, W.J. IgE-mediated food allergy--extensive review of the literature. *Acta Clin. Belg.*, 2001, 56(4):234-47.
- 4- Ladics, G.S., Holsapple, M.P., Astwood, J.D., Kimber, I., Knipple, L.M., Helm, R.M., Dong, W. Workshop overview: approaches to the assessment of the allergenic potential of food genetically modified crops. *Toxicol. Sci*, 2003, 73: 8-16.
- 5- Sicherer, S.H and Sampson, H. A: Food Allergy. *J. Allergy Clin Immunol*, 2006, 117: 470-475.
- 6- Sampson, H. A., Sicherer, S. H and Birnbaum, A. H. AGA technical review on the evaluation of gastrointestinal manifestations due to immunologic reactions to foods in infants and young children. *J. Pediatric Gastroenterol Nutr.*, 2000, 30: (suppl): S87-94.
- 7- Anet, J., Back, J.F., Baker, R.S., Barnett, D., Burley, R.W., Howden, M.E. Allergens in the white and yolk of hen's egg. A study of IgE binding by egg proteins. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1985. 77, 364-371.
- 8- Mine, Y and Yang, M. Recent Advances in the Understanding of Egg Allergens: Basic, Industrial, and Clinical Perspectives. *J. Agric. Food Chem.* 2008, 56: 4874-4900.
- 9- Renz, H., Blümer, N., Virna, S., Sel and Gran, H: The immunological basis of the hygiene hypothesis. En: *Allergy and Asthma in Modern Society: A Scientific Approach*. Chem. Immunol. Allergy. Ed. Cramer, R.; Karger. Basilea, Suiza. 2006, 91: 30-48.
- 10- Bischoff, B and Crowe, S. E: Gastrointestinal food allergy: new insights into pathophysiology and clinical perspectives. *Gastroenterology*. 2005, 128: 1089-1113.

- 11- Lehrer, S. B., Horner, W. E and Reese, G: Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Crit Rev. Food Sci. Nutr*, 1996, 36: 553-564.
- 12- Bredehorst, R and David, K: What establishes a protein as an allergen? *J. Chrom. B*, 2001, 756: 33-40.
- 13- Bannon, G: What makes a food protein an allergen? *Curr. Allergy Asthma Rep.* 2004, 4: 54-60.
- 14- Besler, M., Steomjart, H., Paschke, A. Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *J. Chrom. B*, 2001, 756, 207-218.
- 15- Mine, Y and Zhang, J. W: Comparative studies on antigenicity and allergenicity of native and denature egg white proteins. *J. Agric. Food Chem.* 2002, 50: 2679-2683.
- 16- Takagi, K., Teshima, R., Okunuki, H and Sawada, J: Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol. Pharmacol. Bull.* 2003, 26: 969-973.
- 17- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M, Recio, I and Lourdes, A: Effect of  $\beta$ -lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *J. Chromat. Acta*, 2006, 1116: 31-37.
- 18- Jeanson, S., Dupon, D., Grattarol and Rolet-Rópezcaud: Characterization of the Heat Treatment Undergone by Milk Using two Inhibition ELISAs for Quantification of Native and Heat Denatured  $\alpha$ -Lactalbumin. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47: 2249-2254.
- 19- Dupon, D., Rolet-Rópezcaud, O and Muller-Renaud, S: Determination of the Heat treatment Undergone by Milk by Following the Denaturation of  $\alpha$ -Lactalbumin with a biosensor. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52: 677-681.
- 20- Chichón, R., Belloque, J., Alonso, E and López - Fandiño, R: immunoreactivity and digestibility of high-pressure - treated whey proteins. *Int. Dairy Journal.* 2008, 18: 367-376.
- 21- Moreno, F. J., Mellon, F. A., Wickman, M. S. J., Bottrill, A. R and Mills, E. N. C: Stability of the major allergen Brazil nut 2S albumin (Ber1) to physiologically relevant in vitro gastrointestinal digestion. *FEBS Journal.* 2005, 272: 341-352.
- 22- Thomas, K., Aalbers, M., Bannon, G.A., Bartels, M., Dearman, R.J., Esdaile, D.J., and col., A multi-laboratory evaluation of a common in vitro pepsin digestion assay protocol used in assessing the safety of novel proteins. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* 2004, 39, 87-98.
- 23- Taylor, S. L., Lehrer, SB: Principles and characteristics of food allergens. *Critical review in Food Science and Nutrition.* 1996, 36: S165-S186.
- 24- Márquez, U. M. L and Lajolo, F. M: Composition and digestibility of albumin, globulins and glutelins from phaseolus-vulgaris. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 55: 997-1000.
- 25- Nielson, S. S: Degradation of bean proteins by endogenous and exogenous proteases-a review. *Cereal Chem.*, 1988, 65: 435-442.
- 26- Budd, T. W., Kuo, C. Y., Cazin, J and Yoo, T. J: Allergens of *Alternaria*: further characterization of a basic allergen fraction. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 1983, 71: 83-87.
- 27- Kawashima, T., Taniai, M., Usuai, M., Ando, S., Kurimoto, M and Matuhasi, T: Antigenic analysis of Sugi basic protein by monoclonal antibodies: II. Detection of immunoreactive fragments in enzyme-cleaved Cry j 1. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1992, 98: 118-126.
- 28- Astwood, J.D., Leach, J.N., Fuchs, R.L. Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nature Biotechnol.*, 1996, 14, 1269-1273.
- 29- Fu T-J, Abbott UR, Hatzos C. Digestibility of food allergens and non allergenic proteins in simulated gastric fluid and simulated intestinal fluid – A comparative study. *J Agric Food Chem.*, 2002, 50: 7154-7160.
- 30- Kenna, J.G., Evans, R.M. Digestibility of proteins in simulated gastric fluid. *Toxicologist.* 2000, 54: 141.
- 31- Díaz-Perales, A., Blanco, C., Sánchez-Monge, R., Varela, J., Carrillo, T, Salcedo, G. Analysis of avocado allergen (Prs a1) IgE-binding peptides generated by simulated gastric fluid digestion. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, 112: 1002-1007.
- 32- Herman, R. A., Wooshiser, M., Ladics, G., Schafer, B. W and Korjagin, V. A: Digestion Efficiency of allergens and non-allergens in Simulated Gastric Fluid. MRID# 4638801. Washington, DC: U. S. Environmental Protection Agency. 2004.
- 33- Lee, S. K., Ion, S. H., Choi, J. H and Park, S. H: Chestnut as food allergen: Identification of major allergens. *J. Korean. Med. Sci.* 2005, 20: 573-578.
- 34- Goodman, R. E., Hefle, S. L and Van Ree, R: Assessing genetically modified crops to minimize the risk of increased food allergy: a review. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2005, 137: 153-166.