



ALIMENTOS TRANSGÉNICOS Y ALERGENICIDAD

Transgenic foods and allergenicity

Orlando Acosta Losada¹, Carlos Arturo Guerrero Fonseca²,

1. *Profesor Asociado, BSc, MSc, PhD. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina-Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.*
2. *Profesor Asociado, MD, MSc, PhD. Departamento de Ciencias Fisiológicas, Facultad de Medicina-Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.*

Correspondencia: oacostal@unal.edu.co

Resumen

La utilización de la tecnología transgénica en la modificación de las fuentes alimentarias ha permitido desarrollar alimentos menos caros y más saludables. Esta tecnología tiene la potencialidad de reducir el uso de plaguicidas químicos, incrementar la productividad y proteger el hábitat de los humanos y de otras especies. No obstante, los alimentos genéticamente modificados (GM) han dado origen a preocupaciones públicas entre las organizaciones no gubernamentales (NGOs), los consumidores y los medios con relación a su potencial toxicidad, alergenicidad y alteración de los nutrientes. Se presenta una revisión crítica de la literatura reciente sobre las respuestas inmunológicas adversas a las proteínas de los alimentos. Esta revisión incluye las características físicas y químicas de los alérgenos, la heterogeneidad en la prevalencia de la alergia a los alimentos y los

avances en la comprensión de los desordenes alérgicos producidos por alimentos. Se realiza una descripción del espectro clínico de las reacciones alérgicas inducidas por alimentos, las cuales son responsables de una variedad de síntomas que afectan la piel, el tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal. Los métodos utilizados en las pruebas para evaluar la seguridad de los alimentos derivados de los cultivos GM se presentan y discuten. Se concluye que los riesgos alérgicos potenciales introducidos por los alimentos GM no son mayores que los presentados por los alimentos derivados de cultivos modificados genéticamente por los métodos convencionales.

Palabras clave: alimentos, hipersensibilidad a los alimentos, alérgenos, heterogeneidad genética, ADN, glicoproteínas, prueba ELISA.

Acosta O, Guerrero CA. Alimentos transgénicos y alergenicidad. *Rev.Fac.Med.* 2007; 55: 251-269.



Summary

The use of transgenic technology to modify food sources has anticipated the possibility of developing less expensive and healthier food. This technology has the potential of reducing the use of chemical pesticides, increasing the productivity and protecting the environment in which human beings and other species live. However, genetically modified (GM) foods have raised a public concern among nongovernment organizations (ONGs), consumers and media regarding their potential toxicity, allergenicity and impaired nutrition. We present a critical review of the recent literature about the adverse immune responses to food proteins. This review includes the physical and chemical characteristics of allergens, the heterogeneity in the prevalence of food allergy and the

progress made in the understanding of food-based allergic disorders. We present a description of the clinical spectrum of the food-induced allergic reactions which are responsible for a variety of symptoms affecting the skin, the respiratory tract and gastrointestinal tract. The test methods used for the safety assessment of foods derived from GM crops are also presented and discussed. It is concluded that the potential allergenic risks introduced by GM food are no higher than those of food derived from genetically modified crops by conventional methods.

Key words: food, food hypersensitivity, allergens, genetic heterogeneity, DNA, glycoproteins, enzyme-linked immunosorbent assay.

Acosta O, Guerrero CA. Transgenic foods and allergenicity. *Rev.Fac.Med.* 2007; 55: 251-269.

Introducción

La tecnología del DNA recombinante o ingeniería genética implica la combinación de material genético proveniente de diferentes orígenes, lo cual permite la producción de organismos genéticamente modificados (OGMs) al margen de las fronteras impuestas por las especies aisladas reproductivamente. Desde la introducción exitosa de la tecnología del DNA recombinante a principios de la década de los años 1970, la comunidad científica involucrada expresó preocupaciones sobre las propiedades indeseables e impredecibles que tales organismos pudieran exhibir en el evento de que ellos escaparan de las instalaciones físicas donde habían sido producidos. Esto condujo a que tempranamente la comunidad científica en la conferencia celebrada en febrero de 1975 en el Asilomar Conference Center en California (1,2) propusiera las primeras recomendaciones sobre restricciones físicas y biológicas para el desarrollo de esta nueva tecnología, recomendaciones que luego fueron promulgadas por el Instituto Nacional de Salud

(NIH) de los Estados Unidos y organismos similares en otros países.

Hoy, más de tres décadas después de haberse introducido la tecnología, son enormes los impactos que esta ha tenido en la biología, la agricultura y la medicina. Los OGMs se han utilizado no solo en la generación de nuevo conocimiento básico en biología, sino a manera de biorreactores industriales en la producción de medicamentos, vacunas, enzimas y alimentos, entre otros productos (3). Adicionalmente, se han producido plantas con nuevas y deseables características agronómicas, nutricionales y ambientales (4), al lado de animales con mayor desempeño zootécnico (5) o con características útiles en la investigación de enfermedades humanas (6).

El potencial de la tecnología transgénica para modificar las fuentes alimentarias ha anticipado la posibilidad de desarrollar alimentos más baratos y más saludables que podrían contribuir a alimentar una población mundial creciente y a eliminar enfermedades debidas a deficiencias

(7,8,9). Existe el potencial de reducir la utilización de plaguicidas químicos, incrementar la productividad y proteger el hábitat de los humanos y de otras especies. No obstante, con intensidad y ubicación geográfica variables, organizaciones no gubernamentales (ONGs), consumidores y medios, entre otros, expresan preocupaciones públicas sobre los riesgos que la tecnología del DNA recombinante representa para la humanidad, particularmente la producción de alimentos genéticamente modificados (GM). En el presente artículo, nos proponemos presentar y discutir, a la luz de los hallazgos científicos recientes, las preocupaciones y los impactos de la producción, liberación y consumo de alimentos GM en el contexto de los riesgos que estos pudieran representar para la salud en materia de alergenicidad.

Potencialidad alérgica de los alimentos transgénicos

Las proteínas de los alimentos GM constituyen el objeto central de la evaluación de sus potenciales impactos sobre la salud. Se han identificado tres maneras potenciales de producción de efectos adversos sobre la salud: toxicidad, alergenicidad y alteraciones de los nutrientes. En general, como una consecuencia del proceso de producción de un alimento transgénico, la inserción o recombinación aditiva del transgen en el genoma del organismo receptor no es controlada, lo que ha planteado incógnitas sobre posibles efectos pleiotrópicos indirectos (10).

Independientemente de la tecnología utilizada en su producción, incluyendo la milenaria modificación genética propia del mejoramiento a través del cruce y la selección convencional de variedades, las proteínas presentes en los alimentos representan un riesgo alérgico para quien las ingiere. No obstante, este riesgo es considerado en forma particular y específica por

muchos consumidores y miembros de los organismos que regulan la introducción de alimentos GM (10,11). Dada la amplia potencialidad, el poder y la acción deliberada que rodean la ingeniería genética, los gobiernos han tomado acciones para regular los alimentos transgénicos. Los procedimientos de construcción o utilización de GMOs están sometidos a normas de identificación, evaluación y manejo de los riesgos en términos de bioseguridad (12,13). En forma particular, se ha introducido una serie de protocolos, procedimientos o recomendaciones con el fin de determinar y evaluar la alergenicidad de las proteínas presentes en los alimentos GM (14). Estas recomendaciones han sido adoptados por comités científicos y regulatorios de la FAO, (15,16), el NIH, la FDA, el International Life Sciences Institute (17), entre otros organismos regulatorios en varios países. Estos protocolos se han basado en métodos clínicos y de laboratorio utilizados en la evaluación de la potencial alergenicidad de los alimentos. Aunque estos métodos fueron desarrollados para propósitos clínicos, ahora se están utilizando para predecir y para realizar vigilancia post-mercado (18).

Alérgenos

La evaluación y el análisis de una nueva proteína en términos de su potencial alérgico se fundamentan no solo en el entendimiento clínico y epidemiológico de la respuesta alérgica sino en el conocimiento de sus características físicas y químicas. Las alergias a los alimentos se clasifican como Clase 1 si la sensibilización ocurre en el tracto gastrointestinal o como Clase 2 si ocurre a través de la inhalación del alérgeno (19). La mayoría de los alérgenos de la Clase 1 están constituidos por glicoproteínas de masas moleculares de 10 a 70 kDa que comparten algunas características físicas y químicas, son solubles en agua, bastante resistentes al calor y estables al tratamiento con ácidos y proteasas (20). La mayoría



de los alérgenos de la Clase 2 al parecer pertenecen a epítopes conformacionales, los cuales son altamente lábiles al calor, presentando susceptibilidad a la degradación enzimática y dificultad para su aislamiento (21).

Como producto de la identificación, el aislamiento y la caracterización de proteínas alergénicas, se ha concluido que tanto las proteínas animales como de plantas que conforman la amplia mayoría de alérgenos de alimentos, pertenecen a tipos o familias similares de proteínas (21). Los grupos de alérgenos predominantes de las plantas pertenecen a las superfamilias prolamina y cupina y a la familia Bet v 1 que muestra homología con la familia 10 de las proteínas relacionadas con la defensa de la planta. La superfamilia prolamina comprende albúminas 2S, inhibidores de tripsina y amilasas en los cereales y proteínas de transferencia de lípidos no específicas (nsLTPs) (22). La superfamilia cupina incluye las proteínas alergénicas de almacenamiento del maní, la soya y las nueces. La familia Bet v 1 incluye alérgenos de los alimentos de la Clase 2 asociados con la polinosis (trastorno alérgico producido por el polen), los cuales pueden inducir sensibilización a través de las vías respiratorias y producir el síndrome alérgico oral (23).

La mayoría de los alérgenos de las plantas alimenticias están representados por proteínas relacionadas con el almacenamiento o la defensa de la planta (24). Muchas de las proteínas producidas por el sistema de defensa de la planta son alérgenos, los cuales incluyen las proteínas relacionadas con la patogénesis, los inhibidores de proteasas y las proteasas. Las proteínas relacionadas con la patogénesis se generan en la planta como respuesta a algunos patógenos (virus, hongos, parásitos) y a estrés ambiental.

Aunque la variedad de alimentos es enorme, los alimentos implicados en la producción de reac-

ciones alérgicas son relativamente pocos. Igualmente, de los cientos de miles de proteínas diferentes que se ingieren, solamente una fracción relativamente muy pequeña, menos de 1 en 100.000 aproximadamente, podría ser alergénica. La mayoría de las reacciones alérgicas inducidas por alimentos corresponden a la leche, los huevos y el maní en el caso de los infantes en los Estados Unidos, mientras que en la población adulta de este mismo país, el maní, las nueces, el pescado y los mariscos explican la mayoría de estas reacciones. A estos alimentos se puede añadir una lista que incluye la soya, el trigo, el arroz, el maíz, el banano, el frijol, el apio, el kiwi, la oliva, la papaya, la piña, los cítricos, la manzana, el tomate, entre otros; todos ellos modificados genéticamente por métodos convencionales de mejoramiento y no por la moderna ingeniería genética. Aproximadamente 160 alimentos y sustancias relacionadas con alimentos están asociados con la inducción de reacciones alérgicas (25).

Cuando un transgen codifica una proteína conocida de antemano como alérgeno, se puede anticipar con una altísima probabilidad que tal proteína en un ambiente transgénico preservará sus propiedades alergénicas. Este es el caso bien conocido de la albúmina 2S del maní brasilero cuando su gen fue insertado en el genoma de soya con el propósito de elevar el contenido de aminoácidos con azufre en la alimentación animal. Antes de su liberación al mercado, los sueros de pacientes con previa reacción alérgica a este maní reconocieron igualmente el alérgeno presente en la soya modificada genéticamente, así como aquel presente en el maní brasilero (26). Este resultado reveló que la alergenicidad del maní brasilero puede ser transferida a la soya mediante la tecnología transgénica y que de manera similar puede ser evaluada en la planta transgénica utilizando procedimientos estándar. Obviamente, esta soya transgénica no se liberó

al mercado. A una conclusión similar se ha llegado en el caso de la β -lactoglobulina (BLG) recombinante expresada en *E. coli*, la cual retiene las propiedades alergénicas de la BLG secretada en la leche (27).

Cuando no se dispone de información sobre las propiedades alergénicas de la proteína codificada por el transgen, se debe acudir a estrategias alternativas o complementarias. Las estrategias más utilizadas se basan en las homologías (similitudes) de secuencias de aminoácidos entre la proteína en cuestión y alérgenos conocidos (16,28), y la estabilidad al calor y al tratamiento con ácidos y enzimas digestivas. Estas estrategias han sido objeto de algunas críticas y precisiones que reafirman la importancia del estudio caso por caso (29). Una crítica central radica en que la identidad química entre la proteína foránea expresada en el ambiente transgénico y aquella proteína utilizada en las pruebas de alergenicidad no siempre se encuentra garantizada, debido a que la producción masiva de la proteína para las pruebas se obtiene comúnmente a partir de bacterias transgénicas antes que por extracción a partir de la planta transgénica, dado los bajos niveles de expresión en esta última. Esto podría conducir a que modificaciones post-traduccionales de la proteína, tales como la glicosilación, hidroxilación o fosforilación, no ocurrieran en el ambiente transgénico bacteriano, las cuales sí podrían ocurrir en el ambiente transgénico de la planta. Estas modificaciones podrían ser importantes en la determinación de las propiedades alergénicas de las proteínas (30).

Con base en el código genético, la secuencia de aminoácidos de las proteínas puede deducirse a partir de la secuencia de nucleótidos del transgen. La presunción de alergenicidad de una proteína se fundamenta en al menos una similitud de seis a ocho aminoácidos contiguos idénticos o químicamente relacionados, entre la proteína exami-

nada y otra conocida como alérgeno (14). También se presume alergenicidad potencial si en una secuencia de 80 aminoácidos se presenta una similitud mayor de 35 por ciento (16,28). Con propósitos de predicción, se compara la secuencia de aminoácidos de la proteína transgénica con secuencias conocidas de proteínas con epítopes alergénicos. Es obvio que la ausencia de homología de secuencias no es demostrativa de ausencia de alergenicidad, ya que todos los alérgenos no se encuentran caracterizados y no todos son conocidos en su secuencia de aminoácidos. La identificación de los epítopes lineales particulares responsables de la alergenicidad presenta en el momento limitaciones, y más aun aquella relacionada con los epítopes conformacionales, los cuales podrían mediar la inmuno-reactividad. Sin embargo, la mayoría de los alérgenos de plantas pertenecen a unas pocas familias de proteínas que presentan secuencias de aminoácidos altamente conservadas, lo cual podría indicar que estructuras y actividades biológicas conservadas juegan un papel en la inducción de las reacciones alérgicas (10).

Existe una considerable colección de familias de proteínas y dominios los cuales conforman la base de datos de familias de proteínas Pfam (31). Aunque esta base de datos comprende una clasificación de más de 7677 familias de proteínas de acuerdo con la homología de sus secuencias de aminoácidos (23), la limitación en los datos de homología de secuencias para establecer o anticipar la alergenicidad de una proteína, impone que se deba acudir a estudios estructurales, los cuales han aportado análisis de la relación entre estructura y actividad para algunas familias de proteínas que incluyen alérgenos (23,32,33). Un número creciente de alérgenos se ha caracterizado a nivel molecular, facilitando el entendimiento de la inmunopatogénesis de la alergia a alimentos (34). En estudios de proteínas de alimentos alergénicos mediante repre-



sentaciones tridimensionales (35), se ha concluido que los alérgenos no tienen características estructurales únicas, sino que sólo necesitan ser reconocidos como extraños para estimular las células del sistema inmune y los mastocitos.

Aunque comúnmente se asume en términos teóricos que los epítopes responsables de la inmunoreactividad corresponden a regiones hidrofílicas que se ubican en la superficie de la proteína, se ha encontrado en alérgenos presentes en alimentos que la reactividad con la IgE implica desnaturalización y pérdida de la estructura, así como la exposición de regiones de naturaleza hidrofóbica responsables de dicha reactividad (36). Actualmente se dispone de información acerca del mapa de epítopes alérgicos de muchos de los principales alérgenos de los alimentos y los sitios específicos sobre las proteínas que son reconocidos por la IgE de los pacientes sensibilizados (37,38,39). De estos hallazgos se ha podido concluir que tanto los epítopes secuenciales y conformacionales pueden ser responsables de las reacciones alérgicas a los alimentos.

El razonamiento acerca de que la alergenicidad de una proteína reside principalmente en el conjunto de la proteína intacta, ha conducido a que la estabilidad de la proteína en las condiciones ácidas del estómago y en el medio enzimático proteolítico sea examinada especialmente. Se asume que para el desencadenamiento de la reacción alérgica la estabilidad es crucial, de tal manera que ciertas cantidades de proteína pueden llegar al intestino, atravesar la mucosa intestinal y luego ser presentadas a las células del sistema inmunológico. Sin embargo, se han hecho algunas observaciones sobre los ensayos *in vitro* (40) que simulan la digestión gástrica e intestinal de proteínas aisladas, dada la complejidad de la matriz alimentaria en que se encontrarían los alérgenos y las condiciones fisiológicas cambiantes, así como las propiedades de estabilidad de

los alérgenos en condiciones de procesamiento de los alimentos (10).

Por otra parte, se resalta que los alimentos que sensibilizan el sistema inmunológico implican degradación de proteínas seguida por la absorción a través de la mucosa y el procesamiento de los componentes proteicos en las células presentadoras de antígenos o alérgenos, antes del evento de sensibilización. Esto implica que la reacción alérgica puede ser inducida o desencadenada por la forma nativa de la proteína en el alimento o por fragmentos de esta (36,41). También se ha propuesto que el proceso digestivo puede exponer epítopes que antes no lo estaban en la proteína nativa, lo que podría conducir a que estos quedarán accesibles a la IgE (42,43).

Otra consideración se refiere a si la modificación transgénica conduce a que la alergenicidad de la planta hospedera, o del alimento derivado de ella, puede ser incrementada con relación a su contraparte convencional (44,45). Esta consideración se deriva de la posibilidad de efectos pleiotrópicos conducentes a la desregulación de otros genes de la planta hospedera, lo que podría conducir al incremento de algún alérgeno previamente existente en el organismo receptor del gene foráneo o la modificación de otras proteínas imprimiéndole características inmunoreactivas. No obstante, es difícil disponer de procedimientos predictivos en este sentido, por lo que se ha recomendado hacer un seguimiento al alimento transgénico después de su introducción al mercado con el fin de establecer posibles efectos sobre la salud pública (10,18).

Prevalencia de las reacciones alérgicas a alimentos

La alergia a los alimentos es la primera causa de las reacciones anafilácticas sistémicas tratadas en los departamentos de urgencia de los hospi-

tales en el mundo occidental (20). Aunque la mayoría de las personas no experimenta reacciones adversas a los alimentos, la alergia a estos se desarrolla en un pequeño porcentaje de la población. La alergia a los alimentos afecta aproximadamente al 6-8 por ciento de los niños menores de tres años, al 1.5-2 por ciento de la población adulta (46,47) y aproximadamente al 2-3 por ciento de la población norteamericana en general (48), aunque estudios más recientes indican que se estaría acercando a aproximadamente el cuatro por ciento (21,49). Con relación al incremento de la prevalencia de la alergia a alimentos, se ha lanzado la hipótesis de "higiene", la cual supone que la excesiva profilaxis antibacteriana favorece el aumento de las alergias (50). Algunos estudios aportan evidencia acerca de una colonización bacteriana diferencial en niños alérgicos en comparación con aquellos no alérgicos (51).

La estimación de la prevalencia de reacciones alérgicas a alimentos varía ampliamente dependiendo si se utiliza el desafío con alimento controlado por placebo en doble-ciego (DBPCFC) o si se reciben los reportes de los pacientes y sus familias. En un estudio prospectivo de niños, el 6 por ciento de ellos presentó intolerancia o alergia a alimentos confirmada con DBPCFC, lo cual fue sensiblemente más bajo que el 28 por ciento derivado de los reportes de los padres (48). No obstante, se ha reconocido la incertidumbre que existe alrededor de la prevalencia de la alergia a alimentos en las poblaciones. En un meta-análisis realizado sobre una selección de publicaciones desde 1990 relacionadas con alergia inducida por los alimentos más representativos, se encontró una marcada heterogeneidad en la prevalencia (52). Además, la prevalencia auto-reportada fue mucho mayor que la determinada objetivamente. Esta heterogeneidad fue atribuida al diseño, a la metodología o a las diferencias entre las poblaciones.

Hipersensibilidad a los alimentos

El desarrollo de alergias comúnmente ocurre en la temprana infancia antes de los tres años de edad. El evento alérgico implica mecanismos relacionados con la naturaleza del alérgeno presente en el alimento, el tracto gastrointestinal y el sistema inmune (53). La alergia a los alimentos se ha descrito como una respuesta anormal del sistema inmune de la mucosa a los antígenos presentes en el tracto gastrointestinal. Este sistema, a diferencia del sistema inmune sistémico, enfrenta cantidades relativamente grandes de antígenos y de manera general suprime la inmuno-reactividad contra antígenos foráneos inofensivos como las proteínas de los alimentos y organismos de la flora intestinal. La barrera de la mucosa gastrointestinal es una estructura compleja (54) en términos fisicoquímicos e inmunológicos (celulares) que evita la penetración de antígeno foráneos. La modificación de las condiciones de esta barrera puede promover alergia a alimentos (34). El tracto gastrointestinal presenta varias barreras no específicas (mucosidad, uniones de las células epiteliales, acidez, enzimas) a la entrada de proteínas foráneas, y otra específica representada en la IgA secretoria producida por el sistema inmune.

No obstante, la inmadurez en el desarrollo de varios de los componentes de esta barrera conduce a que su eficiencia en el infante se vea reducida, lo que podría explicar el aumento de la prevalencia de infecciones gastrointestinales y la alergia a alimentos observada durante los primeros años de vida (21). Aunque algunos antígenos de los alimentos ingeridos pueden traspasar el tracto gastrointestinal y transportarse en el torrente sanguíneo en forma inmunológicamente intacta, raras veces parecen inducir síntomas clínicos debido a que se han desarrollado mecanismos que permiten asegurar que el sistema inmune no ataque las proteínas propias ni



las proteínas presentes en los alimentos. Este mecanismo se conoce con el nombre de tolerancia y constituye una barrera al desarrollo de alergia a los alimentos (34,55). Recientemente se han identificado alteraciones de la permeabilidad intestinal en pacientes con reacciones adversas a los alimentos, las cuales no son estrictamente dependientes de los procesos mediados por IgE (56).

Se asume que la susceptibilidad genética juega un importante papel en el desarrollo de la respuesta alérgica a los alimentos (57,58), aunque los factores genéticos no se han elucidado aun. Varias observaciones sugieren que la hipersensibilidad a alimentos se puede desarrollar en individuos con susceptibilidad genética (59), posiblemente debido a que no se desarrolló una tolerancia normal o ésta se rompió permitiendo que las reacciones mediadas por la IgE se desencadenen y que los anticuerpos IgE específicos contra proteínas de los alimentos, presentes sobre los mastocitos y eosinófilos, entren en contacto con los alérgenos circulantes del alimento y activen las células para liberar mediadores y citocinas (21). En estudios de variabilidad individual de las respuestas mediadas por IgE, se ha descrito un polimorfismo en el gen CD14 asociado con altos niveles de IgE y alergia a alimentos (60). Se ha considerado que en el desencadenamiento de la reacción alérgica la predisposición genética es un factor adicional a la antigenicidad de una molécula determinada por su tamaño, el reconocimiento como extraña, la cantidad de antígeno y el tiempo de exposición (61).

Manifestaciones clínicas de la alergia a alimentos

Para evaluar los impactos de la alergia a alimentos en el ámbito de la salud pública, se debe tener en cuenta no solo su prevalencia en la población sino también su espectro clínico. Las

reacciones adversas a los alimentos pueden ser referidas de manera general como hipersensibilidades a los alimentos, lo cual puede ser el resultado de una reacción anormal ocasionada por la ingestión de alimentos. Esta reacción anormal puede explicarse como resultado de una intolerancia al alimento (hipersensibilidad a alimento no alérgica) o como una reacción de hipersensibilidad o alergia al alimento (21). En los estándares norteamericanos, la alergia es definida como hipersensibilidad, que para el caso implica una reacción inmunológica a los alimentos, mientras que aquellas reacciones no inmunológicas a los alimentos se las reconoce como intolerancia. Por otra parte, la Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica utiliza el término hipersensibilidad no-inmunológica a alimentos para referirse a la intolerancia, mientras que se refiere a la hipersensibilidad como alergia a alimentos, independientemente de que ésta sea mediada o no por la IgE (18).

Por otra parte, las intolerancias a los alimentos se definen como reacciones adversas causadas por una característica fisiológica distintiva del paciente, como por ejemplo los errores y desordenes innatos metabólicos asociados a deficiencias enzimáticas en el sistema digestivo, tal como sucede con la intolerancia a la lactosa. También se puede presentar intolerancia como consecuencia de efectos farmacológicos de aminos vasoactivas contenidas en los alimentos, tales como la histamina (62). En estos términos, a diferencia de las intolerancias, las hipersensibilidades o alergias a alimentos afectan solamente a aquellos individuos que han desarrollado reacciones o respuestas inmunológicas adversas o anormales a alimentos (21).

El diagnóstico de la alergia a los alimentos se realiza utilizando la historia clínica y pruebas cutáneas y serológicas, aunque una confirmación final se obtiene a través de la realización de

un DBPCFC (63,64). Las alergias a los alimentos pueden ser mediadas inmunológicamente por IgE o por células (21). Sin embargo, las reacciones mediadas por la IgE son las más comunes en la población en general, mientras que aquellas no-mediadas por IgE explican una alta proporción de las alergias a alimentos en infantes y niños jóvenes. Las alergias mediadas por IgE se presentan dentro de minutos u horas después de la ingestión del alérgeno, pero las manifestaciones alérgicas pueden ser más tardías cuando el alérgeno presente en el alimento ha sido ingerido con mayor frecuencia, lo cual puede conducir a síntomas propios de una reacción inflamatoria crónica que pueden durar varios días (21).

La alergia a alimentos mediada por IgE, además de ser la más común, es la más peligrosa de las reacciones adversas a los alimentos. Esta reacción se inicia por una interferencia de la tolerancia oral normal a los alimentos en los individuos susceptibles (62). Entre los desórdenes mediados por IgE se citan los cutáneos (Urticaria, angioedema, erupción morbiliforme y rubor), los gastrointestinales (Síndrome alérgico oral, anafilaxis gastrointestinal), respiratorios (rinoconjuntivitis aguda y broncoespasmo con sibilancia) y generalizados (choque anafiláctico). Los mediados por la mezcla de IgE y células incluyen los cutáneos (Dermatitis atópica), los gastrointestinales (Esofagitis eosinofílica alérgica, gastroenteritis eosinofílica alérgica) y respiratorios (Asma). Los mediados por células comprenden los cutáneos (Dermatitis de contacto, dermatitis herpetiformis), los gastrointestinales (Enterocolitis inducida por proteínas de los alimentos, proctocolitis inducida por proteínas de los alimentos, síndromes enteropáticos inducidos por proteínas de los alimentos, enfermedad celíaca), y los respiratorios (Hemosiderosis pulmonar inducida por alimento-Síndrome de Heiner) (21). La severidad y la variedad de las

reacciones a los alimentos son impredecibles. Un alimento que ocasiona generalmente una reacción leve puede inducir una reacción severa si es consumido a continuación de una ingesta de alcohol, aspirina, inhibidores de la ACE o bloqueadores beta, o inmediatamente antes de ejercicio (65,66).

Hipersensibilidades cutáneas. En la alergia mediada por IgE se induce una variedad de reacciones de hipersensibilidad en la piel. Entre aquellas de aparición más inmediata se pueden citar la urticaria y angioedema agudos después de la ingestión del alimento, aunque la presentación crónica de urticaria o angioedema con duración de más de seis semanas es poco común como consecuencia de alergia a alimentos (21,67). La urticaria aguda de contacto debida a alimentos es poco común, aunque otra entidad, la dermatitis de contacto inducida por alimentos, se observa comúnmente entre operarios que manipulan alimentos, especialmente pescados, mariscos, carnes y huevos (68). Los niños pueden desarrollar dermatitis atópica dentro de 10 a 90 minutos después de la ingestión, caracterizada por una erupción rojiza, irritativa (prurito) y morbiliforme parecida al sarampión (69), aunque la ingestión repetida del alérgeno puede ocasionar una erupción irritativa eczematosa (70).

Hipersensibilidades respiratorias. La alergia a los alimentos también puede comprometer el tracto respiratorio superior e inferior (71,72). Se ha reportado que la alergia a alimentos puede producir hiper-reactividad en vías aéreas en pacientes con asma (73). También se ha encontrado en dos estudios que 6-8 por ciento de los pacientes asmáticos estudiados presentaron inducción de sibilancia debido a la ingestión de alimentos (74,75). El asma es una manifestación poco común de alergia a alimentos ingeridos, aunque es usual la presentación de broncoespasmo agudo asociado con otros sínto-



mas inducidos por el alimento (72). No obstante, se ha informado, en la ausencia de broncoespasmo acentuado, de la inducción de hiper-reactividad de vías aéreas y empeoramiento del asma después de la ingestión de cantidades pequeñas de alérgenos presentes en los alimentos en casos de individuos sensibilizados (73). También se ha encontrado que la alergia a alimentos constituye un factor de riesgo mayor para el asma severa (76) y que las proteínas presentes en vapores provenientes de la cocción de alimentos pueden inducir reacciones asmáticas y en ocasiones choque anafiláctico (77,78). Los síntomas asmáticos inducidos por alimentos se sospechan en pacientes con asma refractaria y con historia de dermatitis atópica, reflujo gastrointestinal o alergia a alimentos (21). El síndrome de Heiner, particularmente causado por leche de vaca, es una forma rara de hemosiderosis pulmonar inducida por alimento (79).

Hipersensibilidades gastrointestinales. Los síntomas de la alergia a alimentos también implican la orofaringe y el tracto gastrointestinal, presentándose pocos minutos después de la ingestión del alérgeno. Se han demostrado como secundarios a la alergia a alimento la irritación (prurito) y el angioedema de labios, lengua y paladar blando, así como náusea, dolor abdominal, vómito y diarrea (18). El síndrome alérgico oral se encuentra limitado exclusivamente a la orofaringe y se ha reportado más comúnmente en pacientes con rinitis alérgica estacional después de la ingestión de frutas y vegetales frescos (80,81). La anafilaxis gastrointestinal acompaña frecuentemente los síntomas de la piel o del tracto respiratorio, presentando típicamente náusea aguda, calambres y dolor abdominal, vómito y diarrea, y generalmente se presentan síntomas alérgicos en otros órganos blanco (20,21). La ingestión repetida del alérgeno en el alimento, induce una de-sensibilización parcial en niños jóvenes, lo cual hace los síntomas me-

nos obvios (82). En el caso de pacientes afectados con cólico infantil, sólo una minoría presentó síntomas atribuidos a alergia a alimentos mediada por IgE (83).

Hipersensibilidad generalizada. En las unidades de urgencia de los Estados Unidos se ha reportado que la mayor causa de anafilaxis corresponde a la anafilaxis sistémica o generalizada inducida por alergia a alimentos (84,85,86). En casos de reacciones anafilácticas fatales se ha encontrado que correspondían a adolescentes o adultos jóvenes con historia previa de reacción alérgica a alimentos, padecían de asma y habían ingerido el alérgeno responsable presente en el alimento, en la gran mayoría de los casos maní y nueces (84,85,87,88). También se ha reconocido choque anafiláctico, especialmente en mujeres jóvenes, asociado a ejercicio realizado 2-4 horas después de la ingestión de ciertos alimentos (89,90). Además de la expresión variable de síntomas cutáneos, respiratorios y gastrointestinales, los individuos afectados pueden presentar síntomas cardiovasculares como hipotensión, colapso vascular y arritmias cardíacas (91).

Evaluación de la alergenicidad de los alimentos GM y de nuevas proteínas

Para la evaluación y predicción de riesgos alergénicos producidos por los efectos indirectos o no intencionados de la modificación genética conseguida con la moderna tecnología transgénica, o con los métodos convencionales de mejoramiento genético, no se dispone en el momento de un método consensuado. Sin embargo, se han recomendado estudios químicos, proteómicos y de huella digital de la expresión génica a nivel de mRNA, caso por caso, con el fin de determinar diferencias en la expresión total de proteínas de la planta transgénica y la convencional (45). Aunque las prácticas de evalua-

ción del riesgo alergénico para alimentos GM se han considerado apropiadas de manera general, se hace necesario que se fortalezcan y mejoren en la medida en que el conocimiento sobre el mecanismo de las reacciones alérgicas se acrecienta. Para abordar la alergenicidad potencial de los alimentos GM se organizó un plan en la forma de un árbol de decisiones (16,92), el cual se considera adecuado en la medida en que igualmente lo sean los métodos clínicos y de laboratorio utilizados en la evaluación (18).

El caso del maíz StarLink. Entre las varias preocupaciones públicas sobre los alimentos GM se encuentra aquella de la alergenicidad, la cual se vio exacerbada por las circunstancias que rodearon la aprobación del maíz StarLink resistente a insectos. El razonamiento básico de la producción de plantas transgénicas resistentes a insectos se resume en que hace casi cerca de medio siglo la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) se viene utilizando como control biológico de insectos en la agricultura. Los biotecnólogos consideraron que el gen que codifica para la proteína responsable del efecto insecticida se podría incorporar en plantas transgénicas de maíz con el fin de incrementar la productividad. Los genes Cry1Aa y CryAb fueron los primeros en ser utilizados en la producción de plantas transgénicas resistentes a insectos y luego Cry9c (93,94).

El maíz StarLink producido por Aventis Corporation fue aprobado por la U.S. EPA (Environmental Protection Agency) como un plaguicida para ser comercializado como alimento para animales. Pero en septiembre de 2000 se confirmó que estaba presente como contaminante en alimentos para humanos. La decisión de aprobarlo solo para animales se fundamentó en que contenía el transgen que codificaba para la proteína Cry9c de *Bacillus thuringiensis* (Bt), la cual había sido estable al

calor en comparación con otras proteínas Bt. Esta estabilidad sugirió que podría ser un alérgeno potencial para los humanos, frente a un previo árbol de decisión (95).

Con la intervención de la FDA, la EPA y el Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service, y la National Food Processors Association (NFPA) se obtuvo información relacionada con los eventos potenciales adversos para la salud que podrían estar relacionados con el maíz StarLink en los alimentos procesados (18). Los estudios de la NFPA no encontraron correlación entre la cantidad de exposición a StarLink y los contactos a los servicios de alergias o las quejas de alergias supuestamente debidas a este maíz. Sin embargo, se encontró una asociación positiva entre el número de contactos a los servicios de alergias, presuntamente por el alimento procesado que contenía maíz amarillo, y el intenso cubrimiento de los medios de comunicación sobre los recuerdos de productos relacionados con el maíz StarLink.

La difusión por los medios propició que ciudadanos de 18 estados y otros territorios de los Estados Unidos informaran a la FDA sobre efectos potencialmente adversos a la salud ocasionados por la ingestión de productos hechos con maíz (18). Cincuenta y un personas declararon signos y síntomas que incluyeron desde afecciones gastrointestinales hasta choque anafiláctico. De este grupo, 28 reportes fueron considerados consistentes con la definición clínica de caso. Aunque los 28 pacientes parecieron haber experimentado clínicamente una reacción alérgica inmediata a un alérgeno, el CDC (Centers for Disease Control and Prevention) con sus recursos e infraestructura de vigilancia post-mercado no pudo demostrar que la proteína Cry9c fue realmente el producto que los pacientes habían consumido antes del evento de adverso salud (96). En las pruebas serológicas



realizadas para hipersensibilidad aguda, los anticuerpos IgE específicos contra la proteína Cry9c fueron considerados la herramienta más conveniente para evaluar la sensibilidad de un individuo a esta proteína introducida en el maíz transgénico (18). Aunque en la prueba de ELISA no se encontró reacción positiva entre la IgE y la proteína Cry9c en ninguno de los 28 pacientes examinados, esta prueba fue objeto de críticas debido a que se utilizó una proteína Cry9c recombinante producida en bacterias y no la proteína extraída de la planta transgénica.

Las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) han causado preocupación adicional debido a que existen evidencias de sensibilización, vía inhalación, de individuos expuestos ocupacionalmente a proteínas suspendidas en el polvo de los lugares de trabajo (18,97). Después de aspersiones de control biológico con *B. thuringiensis* kurstaki (Btk), se han encontrado trabajadores con pruebas cutáneas positivas y altos niveles de anticuerpos IgE e IgG dirigidos contra esporas de Btk, las cuales contenían proteínas delta endotoxinas Cry1A y Cry1Ab. Por lo tanto, se debe considerar cualquier sensibilización previa a proteínas que pueda ocasionar una reacción cruzada con la nueva proteína presente en los alimentos GM, siendo la atopia previa un factor de riesgo para los trabajadores positivos en pruebas cutáneas y serológicas. En estudios de asma ocupacional inducida por exposición aérea a proteínas de alimentos, se encontró subsecuente alergia a alimentos en 18 de 51 trabajadores estudiados, en intervalos variables después del establecimiento del asma (18).

Otros estudios sobre proteínas de alimentos GM. En un estudio piloto post-mercado sobre alimentos GM, se determinaron los niveles de anticuerpos IgE específicos contra las proteínas recombinantes fosfinotricin-N-acetiltrans-

ferasa (PAT), 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintasa (CP4-EPSPS) y la toxina Cry9c que confieren resistencia, respectivamente, al herbicida fosfinotricina (glufosinato), al herbicida glifosato y a insectos. Herouet y colaboradores (98) encontraron que la proteína PAT no es tóxica ni presenta características asociadas con alérgenos y además es fácilmente digerida en jugos gástricos simulados (99). La CP4-EPSPS también se ha encontrado que es fácilmente digerida (100) y carece de inmunotoxicidad de acuerdo con ensayos realizados en ratones y ratas alimentadas con soya transgénica (101). Batista y colaboradores (102) realizaron un estudio post-mercado para CP4-EPSPS y Cry1Ab y no encontraron respuesta alérgica a estas dos proteínas en pruebas cutáneas y en “Western blotting”. Takagi y colaboradores (103), utilizando sueros de pacientes alérgicos a alimentos que contenían alérgenos conocidos, no encontraron sueros positivos con IgE específica para PAT, CP4-EPSPS y Cry9c, mediante una prueba de ELISA mejorada y “Western blotting”.

Recientemente se estudió el potencial alérgico de materiales GM aprobados para comercialización en la Unión Europea (102). Tomaron parte individuos, muchos de ellos niños, cuya probabilidad de haber ingerido alimentos genéticamente modificados fue cercana al 100 por ciento. Se examinaron extractos de maíz transgénico que contenían la proteína insecticida Cry1Ab y de soya transgénica resistente a herbicida y que expresaba la proteína PAT, así como estas proteínas puras. En pruebas cutáneas y de reactividad de IgE en “Western blotting”, utilizando sueros de pacientes con alergia documentada a alimentos, incluyendo maíz y soya, no se encontraron individuos que reaccionaran diferencialmente a las muestras transgénicas y no transgénicas incluidas en el estudio ni a las proteínas transgénicas puras. Estos resultados son indicativos de que los alimentos

genéticamente modificados estudiados parecen ser seguros considerando su potencial alergenicidad.

Tomando en consideración el concepto de reactividad cruzada potencial con base en la homología de la secuencia de aminoácidos, se realizó una investigación para determinar si IgE reactiva con la proteína Der p7 de ácaros del polvo casero reaccionaba en forma cruzada con la proteína insecticida Cry1F de Bt, la cual había sido transferida a plantas de maíz para conferirles resistencia a lepidópteros (104). La investigación fue motivada porque ambas proteínas compartían una secuencia idéntica de seis aminoácidos. Los resultados mostraron una ausencia de reactividad cruzada, restando así soporte a la utilización de una similitud en seis aminoácidos como criterio de potencial reactividad cruzada.

Tecnología transgénica y producción de plantas hipoalergénicas

La ingeniería genética también ofrece oportunidades para la producción de plantas hipoalergénicas mediante el silenciamiento de los genes que codifican las proteínas alergénicas. En efecto, se han generado plantas del árbol ballico que no producen el alérgeno mayor de su polen, mediante la estrategia antisentido, la cual opera a nivel post-transcripcional (105). Esta estrategia de silenciamiento de genes puede aplicarse para producir plantas transgénicas con menor potencial alergénico. La tecnología de interferencia de RNA (RNAi), utilizada para el silenciamiento post-transcripcional de genes, ha sido exitosa en la supresión de los alérgenos de arroz (106), soya (107), manzana (108), maní (109) y tomate (110,111).

Aunque los modelos animales han sido objeto de críticas en la evaluación del potencial

alergénico de los alimentos genéticamente modificados, recientemente se presentó un modelo en ratón para evaluar esta potencialidad alergénica y las diferencias en antigenicidad ocasionadas por las modificaciones post-traduccionales (112). Adicionalmente este modelo introdujo la posibilidad de examinar la utilización de las plantas modificadas genéticamente como aproximaciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades alérgicas. La investigación de este modelo animal mostró que el consumo oral de un alimento transgénico que exprese un alérgeno no necesariamente predispone a alergia sino que en efecto puede estimular el desarrollo de una respuesta regulatoria de células T protectora, y de esta manera suprimir el desarrollo de enfermedad alérgica de vías aéreas.

Conclusiones

La predicción de la alergenicidad potencial es un tema central en la evaluación de los alimentos GM. En este propósito, el conocimiento previo sobre la naturaleza alergénica del producto codificado por el transgen y su reactividad con la IgE presente en sueros de pacientes alérgicos constituyen la primera aproximación. Las estrategias alternativas y complementarias incorporan los estudios de la homología (similitud) de las secuencias de aminoácidos con relación a aquellas de los alérgenos conocidos y las propiedades fisicoquímicas de la proteína transgénica.

Los ensayos dirigidos a medir la reactividad de la IgE de suero tienen una gran utilidad clínica. En la determinación de su reactividad con las proteínas transgénicas por medio de la prueba de ELISA, la utilización de proteína recombinante obtenida en bacterias en lugar de la proteína extraída de la planta GM, se ha considerado como una de las limitaciones de esta prueba



evaluativa. Un diagnóstico clínico requiere confirmación de reactividad clínica *in vivo*, evaluada con DBPCFC.

Se debe resaltar la marcada heterogeneidad que existe sobre la prevalencia de la alergia a alimentos en la literatura examinada. Esta heterogeneidad ha sido atribuida al diseño y a la metodología o a diferencias entre las poblaciones. Por lo tanto, comúnmente se recomienda tomar con precaución la prevalencia auto-estimada, y acudir a la estandarización de los métodos y la utilización del DBPCFC bajo una observación clínica apropiada. También se ha recomendado considerar la susceptibilidad a las reacciones alérgicas y los factores de riesgo en los subconjuntos poblacionales atópicos. La exposición ocupacional y la sensibilización previas a proteínas relacionadas, antes de la exposición del consumidor a nuevas proteínas, son aspectos que igualmente hacen parte de las aproximaciones recomendadas para la evaluación de los alimentos GM.

El caso del maíz StarLink constituyó una oportunidad para evaluar la utilidad de los protocolos y la capacidad para realizar vigilancia post-mercado de reacciones alérgicas a alimentos GM. Pero al mismo tiempo, este episodio fue ilustrativo de las limitaciones en ese momento para utilizar herramientas clínicas post-mercado en la evaluación de la alergia a alimentos cuando una nueva proteína ha sido liberada para el consumo. De todas maneras, existen fuertes recomendaciones para el monitoreo obligatorio del impacto alergénico potencial post-mercado de los materiales GM.

Aunque las investigaciones epidemiológicas sobre los impactos de la exposición a alimentos GM pueden incorporar dudas en sus aspectos estadísticos debido a la multiplicidad de factores que pueden pesar en una reacción alérgica en el

conjunto de una población, los riesgos de alergenicidad de los alimentos GM no parecen ser mayores que los poseídos por los alimentos provenientes de cultivos modificados genéticamente con los métodos convencionales de mejoramiento genético, o por los cultivos exóticos introducidos desde otras regiones del mundo, como es el caso del kiwi en Europa, no obstante su bien documentada alergenicidad (113). Obviamente, el riesgo potencial alergénico de los alimentos GM debe ser colocado en el mismo contexto de los cultivos modificados genéticamente por los métodos convencionales y de los introducidos desde otras regiones del mundo. En cierto sentido, los alimentos GM parecen tener una mayor salvaguarda en términos de su alergenicidad o toxicidad potenciales debido a que están sometidos a protocolos o guías de bioseguridad, ausentes en su contraparte convencional.

Referencias

1. **Berg P, Baltimore D, Brenner S, Roblin RO, Singer MF.** Summary Statement of the Asilomar Conference on Recombinant DNA Molecules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1975; 72: 1981-1984.
2. **Berg P.** Asilomar and Recombinant DNA. 2004. http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/articles/berg/index.html
3. **Glick BR, Pasternak JJ.** Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA. 3rd Ed., ASM Press. 2003.
4. **Brookes G, Barfoot P.** GM Crops: The First Ten Years - Global Socio-Economic and Environmental Impacts. *ISAAA Brief*No. 36. ISAAA: Ithaca, NY. 2006.
5. **Rexroad Jr CE, Green RD, Wall RJ.** Regulation of animal biotechnology: Research needs. *Theriogenology.* 2007; 68S: S3-S8.
6. **Leung RKM, Whittaker PA.** RNA interference: From gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacology & Therapeutics.* 2005; 107: 222-239.
7. **Acosta O.** Developing country profiles: Colombia. Proceedings of the international workshop on transgenic potatoes for the benefit of resource-poor farmers in developing countries. Manchester, UK, 2000.

8. **Herrera-Estrella L.** Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer. *Proc Nat Acad Sci USA*. 1999; 96: 5978-5981.
9. **OECD.** Biological Resource Management in Agriculture Challenges and Risks of Genetically Engineered Organisms: Sustainable Agricultural Systems and GMOs. Is Co-Existence Possible? *OECD Science & Information Technology*. 2004; 11: 353-365.
10. **Wal JM.** Biotechnology and allergic risk. *Rev Fr Allergol Immunol Clin*. 2001; 41: 36-41.
11. **Wal JM, Pascal G.** Novel foods and novel hazards in the food chain. In: Risk Assessment in the Food Chain of Children. In: PJ Aggett, HA Kuiper, Eds. Nestle Nutrition Workshop Series, Pediatric Programme 1999; 14: 235-259.
12. **Berg P, Singer MF.** The recombinant DNA controversy: Twenty years later. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92: 9011-9013.
13. **Konig A, Cockburn A, Crevel RWR, Debruyned E, Grafstroeme R, Hammerlingf U, Kimberg I, et al.** Assessment of the safety of foods derived from genetically modified (GM) crops. *Food Chemical Toxicology*. 2004; 42: 1047-1088.
14. **Metcalf DD, Astwood JD, Townsend R, Sampson HA, Taylor SL, Fuchs RL.** Assessment of the allergenic potential of foods derived from genetically engineered crop plants. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1996; 36: S165-86.
15. **FAO/WHO.** Joint Expert Consultation on Foods derived from Biotechnology. Geneva, 2000.
16. **FAO/WHO.** Evaluation of Allergenicity of Genetically Modified Foods Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Allergenicity of Foods Derived from Biotechnology, Rome, Italy, 2001; 22-25 January. http://www.who.int/foodsafety/publications/biotech/en/ec_jan2001.pdf
17. **ILSI.** Safety assessment of viable genetically modified microorganisms used in food. Executive Summary of an ILSI Europe Workshop, Salzburg, Austria, International Life Sciences Institute 1999; 14-16 April.
18. **Bernstein JA, Bernstein IL, Bucchini L, Goldman LR, Hamilton RG, Lehrer S, Rubin C, et al.** Clinical and laboratory investigation of allergy to genetically modified foods. *Environ Health Perspect*. 2003; 111: 1114-1121.
19. **Breiteneder H, Ebner C.** Molecular and biochemical classification of plant-derived food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2000; 106: 27-36.
20. **Sampson HA.** Food Allergy. Part 1: immunopathogenesis and clinical disorders. *J Allergy Clin Immunol*. 1999; 103: 717-28.
21. **Sampson HA.** Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113: 805-819.
22. **Salcedo G, Sánchez-Monge R, Barber D, Díaz-Perales A.** Plant non-specific lipid transfer proteins: an interface between plant defence and human allergy. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1771: 781-791.
23. **Breiteneder H, Mills ENC.** Plant food allergens-structural and functional aspects of allergenicity. *Biotechnology Advances*. 2005; 23: 395-399.
24. **Breiteneder H, Radauer C.** A classification of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol*. 2004; 113: 821-830.
25. **Hefle SL, Nordlee JA, Taylor SL.** Allergenic foods. *Critical Rev Food Sci Nutr*. 1996; 36: S69-S89.
26. **Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK.** Identification of a Brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med*. 1996; 334: 688-692.
27. **Chatel JM, Bernard H, Clement G, Frobert Y, Batt CA, Gavalchin J, Peltres G, et al.** Expression, purification and immunochemical characterization of recombinant bovine beta-lactoglobulin, a major cow milk allergen. *Mol Immunol*. 1996; 33: 1113-1118.
28. **Gendel SM.** Sequence analysis for assessing potential allergenicity. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 964: 87-98.
29. **Wal JM.** Strategies for assessment and identification of allergenicity in (novel) foods. *Int Dairy J*. 1998; 8: 413-423.
30. **Bernard H, Meisel H, Crrminon C, Wal JM.** Phosphorylation is a post translational event which affects IgE binding capacity of caseins. *FEBS Lett*. 2000; 467: 239-244.
31. **Bateman A, Coin L, Durbin R, Finn RD, Hollich V, Griffiths-Jones S, et al.** The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*. 2004; 32:(Database issue):D138-141.
32. **Flower DR.** The lipocalin protein family: a role in cell regulation. *FEBS Letters*. 1994; 354: 7-11.
33. **Douliez JP, Michon T, Elmorjani K, Marion D.** Structure, biological and technological functions of Lipid Transfer Proteins and Indolines, the major lipid binding proteins from cereal kernels. *J Cereal Sci*. 2000; 32: 1-20.
34. **Sicherer SH, Sampson HA.** Food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117(suppl 2): S470-5.
35. **Aalberse RC, Stapel SO.** Structure of food allergens in relation to allergenicity. *Pediatr Allergy Immunol*.



- 2001; 12: 10-14.
36. **Maynard F, Jost R, Wal JM.** Human IgE binding capacity of tryptic peptides from bovine α -lactalbumin. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997; 113: 478-88.
 37. **Rabjohn P, Helm R, Stanley J, West C, Sampson HA, Burks AW, et al.** Molecular cloning and epitope analysis of the peanut allergen, Ara h3. *J Clin Invest.* 1999; 103: 535-42.
 38. **Chatchatee P, Jarvinen KM, Bardina L, Beyer K, Sampson HA.** Identification of IgE- and IgG-binding epitopes on alpha(s1)-casein: differences in patients with persistent and transient cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107: 379-83.
 39. **Ayuso R, Reese G, Lehrer SB, Plante M.** Molecular basis of arthropod cross-reactivity: IgE-binding cross-reactive epitopes of shrimp, house dust mite and cockroach tropomyosins. *Int Arch Allergy Immunol.* 2002; 129: 38-48.
 40. **Astwood JD, Leach JN, Fuchs RL.** Stability of food allergens to digestion in vitro. *Nat Biotech.* 1996; 14: 1269-1274.
 41. **Selo I, Negroni L, Yvon M, Peltre G, Wal JM.** Allergy to bovine 13-lactoglobulin: specificity of human IgE using CNBr derived peptides. *Int Arch Allergy Immunol.* 1998; 117: 20-8.
 42. **Haddad ZH, Kalra V, Verma S.** IgE antibodies to peptic and peptic-tryptic digests of betalactoglobulin: significance in food hypersensitivity. *Ann Allergy.* 1979 Jun;42:368-371.
 43. **Spuergin P, Walter M, Schiltz E, Deichmann K, Forster J, Mueller H.** Allergenicity of m-caseins from cow, sheep, and goat. *Allergy.* 1997; 52: 293-298.
 44. **Burks AW, Fuchs RL.** Assessment of the endogenous allergens in glyphosate-tolerant and commercial soybean varieties. *J Allergy Clin Immunol.* 1995; 96: 1008-1010.
 45. **Kok EJ, Keijer J, Van Hoef AMA, van der Wal-Winnubst ENW, Henkens MHC, Kuiper HA.** mRNA fingerprinting of transgenic food crops. Report of the demonstration programme on Food Safety Evaluation of Genetically Modified Foods as a Basis for Market Introduction, The Hague, 1998: 37- 49, Ministry of Economic Affairs, The Hague, The Netherlands..
 46. **Jansen JJ, Kardinaal AF, Huijbers G, Vlieg-Boerstra BJ, Martens BP, Okthuisen T.** 1994. Prevalence of food allergy and intolerance in the adult Dutch population. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 93: 446-456.
 47. **Young E, Stoneham MD, Petruckevitch A, Barton J, Rona R.** A population study of food intolerance. *Lancet.* 1994; 343: 1127-1130.
 48. **Bock SA.** Prospective appraisal of complaints of adverse reactions to foods in children during the first 3 years of life. *Pediatrics.* 1987; 79: 683-688.
 49. **Munoz-Furlong A, Sampson HA, Sicherer SH.** Prevalence of selfreported seafood allergy in the U.S. [abstract]. *J Allergy Clin Immunol.* 2004; 113 (suppl): S100.
 50. **Strachan DP.** Hay fever, hygiene and household size. *BMJ.* 1989; 299: 1259-1260.
 51. **Bjorksten B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M.** The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish infants. *Clin Exp Allergy.* 1999; 29: 342-346.
 52. **Rona RJ, Keil T, Summers C, Gislason D, Zuidmeer L, Sodergren E, Sigurdardottir ST, Lindner T, Goldhahn K, Dahlstrom J, McBride D, Madsen C.** The prevalence of food allergy: A meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol.* 2007, in press.
 53. **Sampson H.** Adverse reactions to foods: In *Allergy: principles and practice* (Middleton E, Reed CE, Ellis EF, eds 4th Ed. St. Louis: C.V. Mosby Co. 1993; 1661-1686.
 54. **Mayer L.** Mucosal immunity. *Pediatrics.* 2003; 111: 1595-1600.
 55. **Husby S.** Normal immune responses to ingested foods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000; 30 (suppl): S13-9.
 56. **Ventura MT, Polimeno L, Amoroso AC, Gatti F, Annoscia E, Marinaro M, Di Leo E, et al.** Intestinal permeability in patients with adverse reactions to food. *Dig Liver Dis.* 2006; 38: 732-736.
 57. **Sicherer SH.** Clinical update on peanut allergy. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2002; 88: 350-361.
 58. **Morafo V, Srivastava K, Huang CK, Kleiner G, Lee SY, Sampson HA, Li XM.** Genetic susceptibility to food allergy is linked to differential TH2-TH1 responses in C3H/HeJ and BALB/c mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111: 1122-1128.
 59. **Sicherer SH, Furlong TJ, Maes HH, Desnick RJ, Sampson HA, Gelb BD.** Genetics of peanut allergy: a twin study. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 106: 53-6.
 60. **Woo JG, Assa'ad A, Heizer AB, Bernstein JA, Hershey GK.** The -159 C/T polymorphism of CD14 is associated with nonatopic asthma and food allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112: 438-444.
 61. **Hamilton RG.** Assessment of allergic disease. In: *Clinical Immunology* (Rich RR, Fleisher TA, Sheerer WT, Achoeder HW, Kotzin B, eds). 2nd ed. London: Harcourt Health Sciences. 2001; 124.1-124.14.

62. **Ortolani C, Pastorello EA.** Food allergies and food intolerances. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2006; 20: 467-483.
63. **Ortolani C, Bruijnzeel Koomen CA, Bengtsson B et al.** Controversial aspects of adverse reactions to food. European Academy of Allergology and Clinical Immunology (EAACI) reactions to food subcommittee. *Allergy.* 1999; 54: 27-45.
64. **Bindslev Jensen C, Ballmer-Weber BK, Bengtsson U et al.** Standardization of food challenges in patients with immediate reactions to foods—position paper from the European Academy of Allergology and Clinical Immunology. *Allergy.* 2004; 59: 690-697.
65. **Sampson HA.** Food allergy—accurately identifying clinical reactivity. *Allergy.* 2005; 60 (suppl 79): 19-24.
66. **Matsuo H, Morimoto K, Akaki T, Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T, Niihara H, et al.** Exercise and aspirin increase levels of circulating gliadin peptides in patients with wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Clin Exp Allergy.* 2005; 35: 461-46.
67. **Valonkis M, Katsarou-Katsari A, Stratigos J.** Etiologic factors in childhood chronic urticaria. *Ann Allergy.* 1992; 69, 61-65.
68. **Judd L.** A descriptive study of occupational skin disease. *N Z Med J* 1994; 107: 147-149.
69. **Sampson HA, McCaskill CC.** Food hypersensitivity and atopic dermatitis: evaluation of 113 patients. *J Pediatr.* 1985; 107: 669-675.
70. **Sampson HA.** The immunopathogenic role of food hypersensitivity in atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol Suppl.* 1992; 176: 34-37.
71. **Bock SA.** Respiratory reactions induced by food challenges in children with pulmonary disease. *Pediatr Allergy Immunol.* 1992; 3: 188-194.
72. **James JM, Bernhisel-Broadbent J, Sampson HA.** Respiratory reactions provoked by double blind food challenges in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 1994; 149: 59-64.
73. **James JM, Eigenmann PA, Eggleston PA, Sampson HA.** Airway reactivity changes in food-allergic, asthmatic children undergoing double-blind placebo-controlled food challenges. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 153: 597-603.
74. **Novembre, E, de Martino M, Vierucci A.** Foods and respiratory allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 1988; 81: 1059-1065.
75. **Oehling A, Baena Cagnani CE.** 1980. Food allergy and child asthma. *Allergol Immunopathol (Madr).* 1980;8: 7-14.
76. **Roberts G, Patel N, Levi-Schaffer F, Habibi P, Lack G.** Food allergy as a risk factor for life-threatening asthma in childhood: a case-controlled study. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 112: 168-74.
77. **Crespo JF, Pascual C, Dominguez C, Ojeda I, Munoz FM, Esteban MM.** Allergic reactions associated with airborne fish particles in IgE-mediated fish hypersensitive patients. *Allergy.* 1995; 50: 257-61.
78. **Roberts G, Golder N, Lack G.** Bronchial challenges with aerosolized food in asthmatic, food-allergic children. *Allergy.* 2002; 57: 713-7.
79. **Lee SK, Kniker WT, Cook CD, Heiner DC.** Cow's milk-induced pulmonary disease in children. *Adv Pediatr.* 1978; 25: 39-57.
80. **Ortolani C, Ispano M, Pastorello E, Bigi A, Ansaloni R.** 1988. The oral allergy syndrome. *Ann Allergy.* 1988; 61: 47-52.
81. **Pastorello EA, Ortolani C, Farioli L, Pravettoni V, Ispano M, Borga A, et al.** 1994. Allergenic cross-reactivity among peach, apricot, plum, and cherry in patients with oral allergy syndrome: an *in vivo* and *in vitro* study. *J Allergy Clin Immunol.* 1994; 94: 699-707.
82. **Iacono G, Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, Kazmierska I, Lorello D, et al.** Gastroesophageal reflux and cow's milk allergy in infants: a prospective study. *J Allergy Clin Immunol.* 1996; 97: 822-827.
83. **Sampson HA.** 1989. Infantile colic and food allergy: fact or fiction? *J Pediatr.* 1989; 115: 583-584.
84. **Kemp SE, Lockey RF, Wolf BL, Lieberman P.** Anaphylaxis. A review of 266 cases. *Arch Intern Med.* 1995; 155: 1749-1754.
85. **Yocum MW, Khan DA.** Assessment of patients who have experienced anaphylaxis: a 3-year survey. *Mayo Clin Pro.* 1994; 69: 16-23.
86. **Mullins RJ.** Anaphylaxis: risk factors for recurrence. *Clin Exp Allergy.* 2003; 33: 1033-40.
87. **Bock SA, Munoz-Furlong A, Sampson HA.** Fatalities due to anaphylactic reactions to foods. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 107: 191-3.
88. **Scott H, Sicherer, MD, and Hugh A. Sampson, MD.** Peanut allergy: Emerging concepts and approaches for an apparent epidemic. *J Allergy Clin Immunol.* 2007 In press.
89. **Horan R, Sheffer A.** Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Immunol Allergy Clin North Am.* 1991; 11: 757-66.
90. **Romano A, Di Fonso M, Giuffreda F, Quarantino D, Papa G, Palmieri V, et al.** Diagnostic work-up for



- food-dependent, exercise-induced anaphylaxis. *Allergy*. 1995; 50: 818-824.
91. **Pumphrey RS.** Lessons for management of anaphylaxis from a study of fatal reactions. *Clin Exp Allergy*. 2000; 30: 1144-50.
 92. **Metcalfe DD.** Introduction: What Are the Issues in Addressing the Allergenic Potential of Genetically Modified Foods? *Environmental Health Perspective*. 2003; 111: 1110-1113.
 93. **Acosta O.** Genetic engineering of insect resistance in agricultural crops by expression of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin genes. Proceedings of the International Workshop on Transgenic Technology in Plants. (Acosta O. and Webster K.D. eds). Universidad Nacional de Colombia-Scottish Crop Research Institute. Editorial Científica, 1996; 1-19.
 94. **Rowe G, Margaritis A.** 2004. Bioprocess design and economic analysis for the commercial production of environmentally friendly bioinsecticides from *Bacillus thuringiensis* HD-1 kurstaki. *Biotechnol & Bioeng*. 2004; 86: 378-388.
 95. **Bucchini L, Goldman LR.** StarLink corn: a risk analysis. *Environ Health Perspect*. 2002; 110: 5-13.
 96. **CDC.** Investigation of human health effects associated with potential exposure to genetically modified corn: A report to the U.S. Food and Drug Administration from the Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention. 2001;1-24.
 97. **Leser C, Hartmann AL, Praml G, Wuthrich B.** The egg-egg syndrome: occupational respiratory allergy to airborne egg proteins with consecutive ingestive egg allergy in the bakery and confectionery industry. *J Invest Allergol Clin Immunol*. 2001; 11: 89-93.
 98. **Herouet C, Esdaile DJ, Mallyon BA, Debruyne E, Schulz A, Currier T, Hendrickx K, van der Klis R.J, Rouan D.** Safety evaluation of the phosphinothricin acetyltransferase proteins encoded by the pat and bar sequences that confer tolerance to glufosinate-ammonium herbicide in transgenic plants. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2005; 41: 134-149.
 99. **Takagi K, Teshima R, Okunuki H, Sawada J.** Comparative study of in vitro digestibility of food proteins and effect of preheating on the digestion. *Biol Pharm Bull*. 2003; 26: 969-973.
 100. **Okunuki H, Teshima R, Shigeta T, Sakushima J, Akiyama, H, Goda Y, Toyoda M, et al.** Increased digestibility of two products in genetically modified food (CP4-EPSPS and Cry1Ab) after preheating. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2002; 43: 68-73.
 101. **Teshima, R, Akiyama, H, Okunuki, H, Sawada J.** Effect of GM and non-GM soybean on the immune system of BN rats and B10A mice. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*. 2000; 41: 188-193.
 102. **Batista R, Nunes B, Carmo M., Cardoso C, Jose HS, de Almeida AB, Manique A, Bento L, Ricardo, CP, Oliveira MM,** 2005. Lack of detectable allergenicity of transgenic maize and soya samples. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 116: 403-410.
 103. **Takagi K, Teshima R, Nakajima O, Okunuki H, Sawada JI.** Improved ELISA method for screening human antigen-specific IgE and its application for monitoring specific IgE for novel proteins in genetically modified foods. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006; 44: 182-188.
 104. **Ladics GS, Bardina L, Cressman RF, Mattsson JL, Sampson HA.** Lack of cross-reactivity between the *Bacillus thuringiensis* derived protein Cry1F in maize grain and dust mite Der p7 protein with human sera positive for Der p7-IgE. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006; 44: 136-143.
 105. **Bhalla PL, Singh MB.** Knocking out expression of plant allergen genes. *Methods*. 2004; 32: 340-345.
 106. **Tada Y.** Reduction of 14-16 kDa allergenic proteins in transgenic rice plants by antisense gene. *FEBS Lett*. 1996; 391: 341-5.
 107. **Herman EM.** Genetic modification removes an immunodominant allergen from soybean. *Plant Physiol* 2003; 132: 36-43.
 108. **Gilissen LJ, Bolhaar ST, Matos CI, Rouwendal GJ, Boone MJ, Krens FA, et al.** Silencing the major apple allergen Mal d 1 by using the RNA interference approach. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115: 364-9.
 109. **Dodo H, Konan K, Viquez O.** A genetic engineering strategy to eliminate peanut allergy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2005; 5: 67-73.
 110. **Lorenz Y, Enrique E, Le Quynh L, Fotisch K, Retzek M, Biemelt S, Sonnewald U, Vieths S, Scheurer S.** Skin prick tests reveal stable and heritable reduction of allergenic potency of gene-silenced tomato fruits. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118: 711-718.
 111. **Le LQ, Mahle V, Lorenz Y, Scheurer S, Biemelt S, Vieths S, Sonnewald U.** Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 118: 1176-83.

112. Prescott VE, Simon P, Hogan SP. Genetically modified plants and food hypersensitivity diseases: Usage and implications of experimental models for risk assessment. *Pharmacology & Therapeutics*. 2006; 111: 374-383.
113. Gall H, Kalveram KJ, Fork G, Sterry W. Kiwi fruit allergy: a new birch-pollen-associated food allergy. *J Allergy Clin Immunol*. 1994;94:70-76.