

Influencia del procesado térmico, de presión y enzimático sobre el potencial alergénico de frutos secos

María de Fátima Vicente Martín

Máster en Nuevos Alimentos



MÁSTERES
DE LA UAM
2019 – 2020

Facultad de Ciencias

Influencia del procesado térmico, de presión y enzimático sobre el potencial alergénico de frutos secos

María de Fátima
Vicente Martín



FACULTAD DE
CIENCIAS

Director: Carmen Cuadrado Hoyo
Tutor: Mónica Rodríguez García- Risco
INIA, Departamento de Tecnología de los Alimentos



El presente Trabajo Fin de Máster ha sido realizado por María de Fátima Vicente Martín, llevado a cabo en el Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), bajo la dirección de la Dra. Carmen Cuadrado Hoyo y la tutela académica de la Profesora Mónica Rodríguez García-Risco de la Universidad Autónoma de Madrid en el curso académico 2019 /2020.

Nombre y firma del director:

Carmen Cuadrado Hoyo

Nombre y firma del tutor:

Mónica Rodríguez García-Risco

Nombre y firma del alumno:

María de Fátima Vicente Martín

En Madrid, a 9 de junio de 2020

ÍNDICE

PORTADA	1
HOJA DE FIRMAS	2
ÍNDICE DE TABLAS.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
LISTA DE SÍMBOLOS	6
LISTA DE ABREVIATURAS	7
RESUMEN	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 Alergia alimentaria.....	9
1.2 Alergenos alimentarios vegetales	11
1.3 Alergia a cacahuete, pistacho, anacardo, avellana y almendra.....	12
1.4 Modificación de la capacidad alérgica de los alimentos.....	15
2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1 Material vegetal.....	18
3.2 Tratamientos térmicos y de presión.....	18
3.3 Extracción de proteínas de frutos secos.....	19
3.4 Tratamiento enzimático	19
3.5 Análisis electroforético.....	20
3.6 Caracterización de sueros	20
3.7 Inmunodetección	21
3.7.1 Inmunodetección con IgG	21
3.7.2 Inmunodetección con IgE de sueros humanos	21
3.8 Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas.....	22
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	23
4.1 Análisis electroforético, inmunodetección en muestras de cacahuete y selección enzimática....	23
4.2 Análisis electroforético e inmunodetección en muestras de pistacho	27
4.3 Análisis electroforético e inmunodetección en muestras de anacardo	29
4.4 Análisis electroforético, inmunodetección en muestras de avellana y selección enzimática	30
4.5 Análisis electroforético e inmunodetección en muestras de almendra.....	34
4.6 Inmunodetección en harinas de pistacho y anacardo DIC con IgE	35
4.7 Electroforesis e inmunodetección IgE de pistacho y anacardo: condición nativa y reductora....	40
4.8 Identificación de proteínas de pistacho y anacardo DIC mediante LC/MS/MS.....	41
5. CONCLUSIONES.....	44
6. BIBLIOGRAFÍA.....	45

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Alérgenos alimentarios descritos en cacahuete (<i>A. hypogaea</i>)	13
Tabla 2: Alérgenos alimentarios descritos en pistacho (<i>P. vera</i>).....	13
Tabla 3: Alérgenos alimentarios descritos en anacardo (<i>A. occidentale</i>)	13
Tabla 4: Alérgenos alimentarios descritos en avellana (<i>C. avellana</i>).....	14
Tabla 5: Alérgenos alimentarios descritos en almendra (<i>P. dulcis</i>).....	14
Tabla 6: Datos inmunológicos y clínicos de los 11 sueros de pacientes sensibilizados a pistacho y anacardo seleccionados	21
Tabla 7: Proteínas de pistacho y anacardo identificadas por LC/MS/MS en muestras control y tratadas con DIC7	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismo inmunológico en la alergia alimentaria.....	9
Figura 2: Clasificación de las proteínas vegetales.	11
Figura 3: Plan experimental esquematizado. +BM, condiciones reductoras con BME; -BM, Condiciones nativas sin BME; *, muestras tratadas con DIC	17
Figura 4: SDS-PAGE (4-20%) de cacahuete (20µg proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan los posibles alérgenos detectados	24
Figura 5: SDS-PAGE (4-20%) de cacahuete (20µg proteína/carril) de muestras control (0h) y tratadas con enzimas E1-E7 (A-G) a distintos tiempos (1-19h).	27
Figura 6: SDS-PAGE (4-20%) de pistacho (20µg proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan la posición de posibles alérgenos.....	28
Figura 7: SDS-PAGE (4-20%) de anacardo (20µg proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan los posibles alérgenos detectados	30
Figura 8: SDS-PAGE (4-20%) de avellana (20µg proteína/carril) control (ST) y tratada: cocción (C60), autoclave (AU1 y AU2) y DIC (DIC7) (A) y HHP (300-600MPa) (B), junto con sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (A.1 y B.1), anti-11S (A.2 y B.2) y anti-LTP (A.3 y B.3). Las flechas señalan la posición de posibles alérgenos.	31
Figura 9: SDS-PAGE (4-20%) de avellana (20µg proteína/carril) de muestras control (0h) y tratadas con enzimas E1-E7 (A-G) a distintos tiempos (1-19h).	33
Figura 10: SDS-PAGE (4-20%) de almendra (20µg proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan la posición de posibles alérgenos	35
Figura 11: Western Blot con IgE de sueros de pacientes humanos sensibilizados a pistacho y anacardo (1-11) de harinas de pistacho (A) y anacardo (B) (20µg de proteína/carril), de muestras control (A.1 y B.1) y tratadas con DIC 7bar, 120s (DIC7) (A.2 y B.2).....	36
Figura 12: Porcentaje de pacientes que reaccionan con cada banda proteica de pistacho (A) y anacardo (B) sin tratar (ST) y tratados con DIC 7 bar 120 s. Análisis realizado con el software Quantity One (BioRad).	36
Figura 13: Esquema de la desnaturalización de proteínas causada por β-mercaptoetanol (A). SDS-PAGE (4-20%) de pistacho y anacardo (20µg proteína/carril) (B.1 y C.1, respectivamente) y sus correspondientes Western Blot con IgE de suero humano (paciente 9) (B.2 y C.2) de muestras control (ST) y tratadas con DIC 7bar, 120s (DIC7), en condiciones nativas (-BM) y desnaturalizantes (+BM).	40
Figura 14: SDS-PAGE (4-20%) de pistacho (A) y anacardo (B) (20µg proteína/carril). Las bandas proteicas seleccionadas para el análisis con LC/MS/MS aparecen enmarcadas en rojo.	42

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grado centígrado
atm	Atmósfera
bar	Bares
Da	Dalton
g	Gramo
<i>g</i>	Fuerza centrífuga relativa
GPa	Gigapascal
h	Hora
kDa	Kilodalton
kU	Kilounidades
kV	Kilovatio
l	Litro
min	Minuto
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MPa	Megapascal
N.º	Número
s	Segundo
V	Vatio
µg	Microgramo
µl	Microlitro

LISTA DE ABREVIATURAS

60sRP	Proteína ribosómica 60S
AU1	Autoclave 121°C, 118kPa, 30min
AU2	Autoclave 138°C, 256kPa, 30min
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium
BM	β-mercaptoetanol
BSB	Borate Buffered Saline
C60	Cocción 60min
CID	Collision-induced dissociation
DIC	Despresurización Instantánea Controlada
DIC7	DIC 7bar, 120s
DTT	Dithiothreitol
EAACI	Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica
Fig.	Figura
HHP	Altas presiones hidrostáticas
IgE	Inmunoglobulina E
IgG	Inmunoglobulina G
LC/MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
m/z	Masa/Carga
MDL	Enzima mandelonitrilo liasa
nsLTP	Proteínas transferidoras de lípidos
p/v	Peso/Volumen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PBST	Phosphate Buffered Saline – Tween20
PMF	Peptide Mass Fingerprinting
PVDF	Polyvinylidene Difluoride
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SSIP	Sensibilización sin ingesta previa
ST	Sin tratar
TLP	Proteína tipo taumatina
TRIS-HCL	Tris(hidroximetil)aminometano Hidrocloruro
Var.	Variedad
WB	Western-Blot
WHO/IUIS	Organización Mundial de la Salud/Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas

RESUMEN

Los frutos secos son uno de los alimentos más frecuentemente implicados en reacciones alérgicas lo que se considera un grave problema de salud. Estudios previos han demostrado que el procesado de alimentos puede producir cambios estructurales y/o conformacionales en las proteínas, alterando su capacidad alérgica. En este estudio se analiza la influencia del procesado térmico (cocción), presión (Altas Presiones Hidrostáticas, HHP), la combinación de ambos (autoclave y Despresurización Instantánea Controlada, DIC) y tratamiento enzimático en la capacidad alérgica de distintos frutos secos: cacahuete, pistacho, anacardo, avellana y almendra, mediante el análisis de su perfil electroforético y de inmunodetección con anticuerpos IgG frente a proteínas potencialmente alérgicas y, además, en pistacho y anacardo con anticuerpos IgE de suero de pacientes sensibilizados y espectrometría de masas (LC/MS/MS). Los resultados indican que cocción y HHP no son efectivos en la reducción de alergenidad, mientras que el autoclave, DIC e hidrólisis enzimática inducen una reducción en el número e intensidad de bandas proteicas, lo que resulta en una notable disminución en la detección de proteínas potencialmente alérgicas. Por lo que, el procesado con estos tratamientos podría resultar altamente efectivo para reducir o incluso abolir la capacidad alérgica de estos frutos secos.

ABSTRACT

Tree nuts are one of the most frequently involved foods in allergic reactions and food allergy is considered to be a serious health problem. Previous studies have demonstrated that food processing can produce structural and/or conformational changes in proteins by altering their allergenic capacity. In this work, the influence of thermal processing (boiling), pressure (High Hydrostatic Pressure, HHP), a combination of both (autoclaving and Instant Controlled Pressure Drop, DIC) and enzymatic treatment on the allergenic capacity of several tree nuts: peanut, pistachio, cashew, hazelnut and almond is studied. This has been carried out by analysing their electrophoretic and immunodetection profile by using IgG antibodies against potentially allergenic proteins in all the nuts and, in pistachio and cashew by IgE antibodies from sensitization patient sera and mass spectrometry (LC/MS/MS). The results support that boiling and HHP are not effective in reducing allergenicity, while autoclaving, DIC and enzymatic hydrolysis reduce the number and intensity of protein bands. That results in a remarkable decrease of the detection of potentially allergenic proteins. Therefore, the processing with these treatments could be highly effective in reducing, or even abolishing the allergenic capacity of these tree nuts.

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Alergia alimentaria

La alergia alimentaria se define como una reacción de hipersensibilidad mediada por mecanismos inmunológicos que se produce en individuos sensibles tras la ingestión, contacto o inhalación de un alérgeno alimentario presente en un alimento o aditivo^{1,2}. La Academia Europea de Alergia e Inmunología Clínica (EAACI), incluye dentro de esta definición las alergias alimentarias mediadas por: inmunoglobulina E (IgE), por células (no mediadas por IgE) o por ambas (mixtas)³. El presente trabajo se centra en la alergia alimentaria mediada por inmunoglobulinas E (IgE), desarrollada en dos etapas (Figura 1): La primera fase es la de sensibilización, en la que el individuo ingiere por primera vez el alimento que contiene el alérgeno y, se activa la respuesta inmune frente a nutrientes que deberían ser tolerados en vez de reconocidos como extraños. Esta respuesta inmune genera IgE específicas capaces de reclutar y activar mastocitos, basófilos y macrófagos. En el siguiente contacto con el alimento se produce la segunda fase denominada de reacción, en la que las IgE específicas generadas en la primera fase reconocen el alérgeno generando respuesta inmunitaria mediada por histamina y sintomatología⁴.

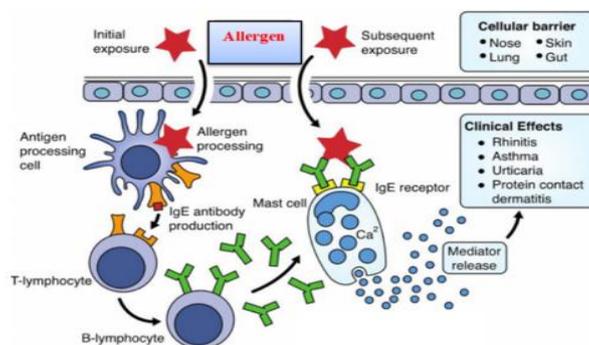


Figura 1: Mecanismo inmunológico en la alergia alimentaria.⁵

Los alérgenos alimentarios son componentes específicos de los alimentos capaces de inducir la reacción alérgica, usualmente son proteínas^{3,6}. Actualmente no se conocen las características que determinan la alergenidad de una proteína, pero sí se sabe que la estabilidad es un factor clave para la sensibilización y la inducción de síntomas en la exposición por vía digestiva, diferenciando dos tipos de alérgenos alimentarios: los lábiles y los estables frente a temperatura, pH ácido, acción de enzimas digestivas y a agentes surfactantes como sales biliares⁷.

El Subcomité de Nomenclatura de Alérgenos de la WHO/IUIS (Organización Mundial de la Salud/Unión Internacional de las Sociedades Inmunológicas: www.allergen.org) recoge más de 120 alérgenos alimentarios, estos se clasifican en alérgenos mayores o menores en función de

la frecuencia con la que son detectados por IgE específica de pacientes: cuando la frecuencia es superior al 50% se habla de alérgeno mayor y, por debajo de alérgeno menor. Según el Reglamento 1169/2011 sobre la información alimentaria facilitada al consumidor, 14 alimentos alergénicos se han clasificado como de declaración obligatoria, aunque sólo exista la posibilidad de existencia de trazas: cereales con gluten, crustáceos, huevos, pescado, cacahuete, soja, lácteos, frutos secos, apio, mostaza, sésamo, moluscos, altramuces y sulfitos.

La alergia alimentaria es un problema de salud que afecta al 1–3% de la población general, siendo más elevada en la población infantil, que alcanza hasta el 8%^{8,9}. La prevalencia de la alergia alimentaria se ha incrementado en los últimos años, principalmente en los países desarrollados¹⁰. Sin embargo, los datos son limitados debido a la discrepancia conceptual y a los diferentes criterios de diagnóstico utilizados¹¹. Según la EAACI, en niños las alergias más usuales son a la leche de vaca y al huevo, mientras que cacahuete, frutos secos, pescado y mariscos son las más comunes entre la población adulta, sin embargo, estos datos pueden variar en función de la población o el área geográfica^{12,13}. Actualmente se discuten varios factores que pueden influir en el desarrollo de alergias alimentarias, tales como: fumar o ser fumador pasivo, contaminación, niveles alterados de vitamina D, una mayor higiene, la dieta de la madre durante el embarazo y/o lactancia y el momento de introducción de alimentos en el niño¹⁰.

La alergia alimentaria mediada por IgE tiene una importante repercusión desde el punto de vista clínico, ya que conlleva la aparición de reacciones graves que pueden llegar a ser mortales. La gravedad de la sintomatología depende del tipo y cantidad de alérgeno consumido, la preparación del alimento y de la sensibilidad del paciente. Las reacciones alérgicas a alimentos ocurren entre unos minutos y una hora tras el consumo del alimento, aunque en raras ocasiones pueden alcanzar los días o las semanas^{1,6,14}. Presentan, además, un amplio espectro de síntomas que pueden afectar a la piel (urticaria, dermatitis atópica), sistema gastrointestinal (vómitos, diarrea o cólicos), respiratorio (estornudos, tos o asma), o multisistémica, es el caso de la anafilaxia una reacción alérgica que afecta a todo el cuerpo y es potencialmente mortal^{3,6}.

En la actualidad no existe cura para la alergia alimentaria, el tratamiento más usual es la dieta de eliminación, es decir, la supresión de los alimentos causantes de la dieta. Este tratamiento genera dos problemas: por una parte, las necesidades y compromisos nutricionales pueden afectar a la calidad de vida³ y, por otra, se pueden dar procesos de contaminación cruzada durante la preparación, almacenamiento y servicio de los alimentos, debidos a mala separación, mal etiquetado o malas prácticas de trabajo¹, causando la ingesta involuntaria de los alérgenos

y el desarrollo de reacciones alérgicas. Para evitarlo, los médicos recetan antihistamínicos para reducir los síntomas típicos de la alergia¹⁴ o adrenalina para mejorar los síntomas de la anafilaxia¹⁵. Recientemente, se han aplicado algunas estrategias capaces de inducir tolerancia a diferentes alérgenos alimentarios mediante la exposición diaria a dosis crecientes de los alimentos alérgicos, mediante su administración subcutánea, epicutánea, sublingual u oral¹⁶.

1.2 Alérgenos alimentarios vegetales

Los alérgenos alimentarios vegetales se pueden clasificar en familias y superfamilias en función de sus propiedades estructurales y funcionales: dentro de las familias se agrupan proteínas que tienen una identidad de secuencia igual o superior al 30%, o inferior si su función y estructura es muy similar; las familias que presentan un posible origen evolutivo común se agrupan en superfamilias¹⁷. En plantas existen tres grandes tipos de proteínas según la función que desempeñan (Figura 2): estructurales y metabólicas, de almacenamiento y de defensa⁷.

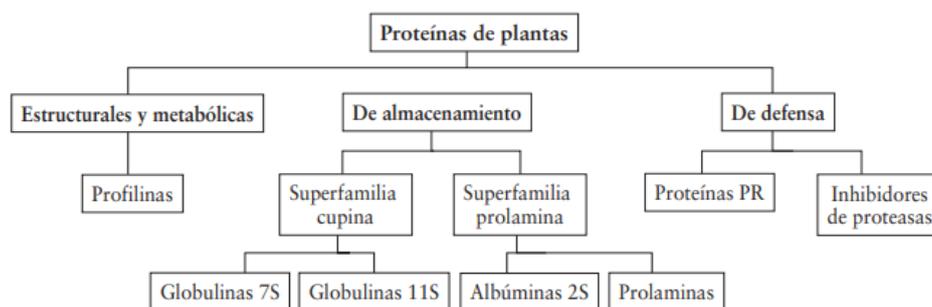


Figura 2: Clasificación de las proteínas vegetales.⁷

El 60% de los alérgenos alimentarios vegetales pertenecen a 4 familias de proteínas¹⁸. Las profilinas, son proteínas citosólicas de 12-15kDa, su función está relacionada con la unión a actina monomérica, participan en la polimerización y reorganización de microfilamentos durante la citocinesis o el crecimiento celular. Se ha demostrado que las profilinas de alimentos presentan reactividad cruzada con polen y que son bastantes sensibles a la desnaturalización por calor y a la digestión gástrica, la alergia alimentaria causada por estas proteínas se limita a síntomas orales, provocados por alimentos crudos en pacientes sensibilizados previamente por vía respiratoria a la profilina de pólenes^{17,18}. La superfamilia de las cupinas son proteínas de reserva que presentan una estructura tridimensional en forma de barril β (*cupa* en latín significa barril) y pueden presentar uno o dos dominios cupina¹⁸. Dentro de este grupo, las globulinas han sido las más estudiadas, constituyen el 50% del contenido proteico total de semillas y son potencialmente alérgicas pues, resisten al calor y forman agregados estables durante la digestión enzimática interactuando con el sistema inmune. Se dividen en dos grupos en función

de su coeficiente de sedimentación: las vicilinas 7S son triméricas, su peso molecular varía entre 150-190kDa; y leguminas 11S, proteínas de estructura hexamérica de unos 360kDa⁷. Las proteínas de la superfamilia prolamina presentan un dominio conservado de 8 residuos de cisteína, se subdividen en cuatro grupos: prolaminas de cereales, proteínas transportadoras de lípidos (nsLTP), inhibidores de α -amilasa o tripsina y albúminas 2S^{17,18}. Las albúminas 2S son proteínas de reserva pequeñas de 10 a 15kDa y presentan 4 puentes disulfuro, lo que les confiere una estructura compacta y estable, además, son capaces de fijar lípidos lo que aumenta su resistencia a la proteólisis⁷. Además de estos tres grandes grupos destacan las proteínas de defensa de la planta (proteínas PR), que se activan frente a estreses bióticos y abióticos. Se comportan como panalérgenos, lo que explica la reactividad cruzada entre distintas especies vegetales y las asociaciones con alergia al polen y al látex (*Hevea latex*)⁷.

1.3 Alergia a cacahuete, pistacho, anacardo, avellana y almendra

Los frutos secos (frutos de cáscara y cacahuetes) son alimentos ricos en nutrientes, grasas insaturadas y compuestos bioactivos, como proteínas vegetales, fibra, minerales, tocoferoles, fitoesteroles y compuestos fenólicos. Debido a esta composición presentan efectos beneficiosos para la salud cardiovascular y metabólica, estudios epidemiológicos han asociado su consumo con una menor incidencia de enfermedad coronaria, cálculos biliares, diabetes en mujeres, hipertensión, cáncer, inflamación, presión sanguínea y síndrome metabólico; produciéndose estos efectos sin un aumento de peso indebido¹⁹. Sin embargo, uno de los principales problemas que presenta su consumo es el desarrollo de alergias, de hecho, los frutos secos son, después de las frutas, los alérgenos más implicados en las reacciones alérgicas en España (26%)²⁰.

El cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) pertenece a la familia *Fabaceae* es una de las legumbres más consumidas en el mundo, aunque comúnmente se considera un fruto seco debido a su similitud en cuanto a perfil nutricional¹⁹. La alergia a cacahuete afecta entre el 1 y el 3% del mundo occidental, mostrando una sintomatología frecuentemente asociada a anafilaxia²¹. Comparado con otras alergias alimentarias diagnosticadas desde la infancia como la leche y el huevo, la alergia a cacahuete tiene una baja probabilidad de resolución²². Hasta la fecha, la WHO/IUIS ha reconocido 17 alérgenos de cacahuete (Ara h 1 - Ara h 17) (Tabla 1) y se han reconocido como alérgenos principales Ara h 1 (vicilina de 64kDa), Ara h 2 (conglutina de 17kDa) que son reconocidos por el 70-90% de los sujetos sensibilizados y el alérgeno menor Ara h 3 (legumina 11S de 60kDa)^{8,23}.

Tabla 1: Alérgenos alimentarios descritos en cacahuete (*A. hypogaea*)

Alérgeno	Tipo de proteína	Función	Peso molecular
Ara h 1	Vicilina 7S	Reserva	64 kDa
Ara h 2	Albúmina 2S	Reserva	17 kDa
Ara h 3	Legumina 11S	Reserva	60 kDa
Ara h 5	Profilina	Regulación	15 kDa
Ara h 6 y 7	Albúmina 2S	Reserva	15 kDa
Ara h 8	PR-10	Defensa	17 kDa
Ara h 9	nsLTP	Transportadora lípidos	9,8 kDa
Ara h 10 y 11	Oleosina	Estructural	16 y 14 kDa
Ara h 12 y 13	Defensina	Defensa	12 y 11 kDa
Ara h 14 y 15	Oleosina	Estructural	12,5 y 17 kDa
Ara h 16 y 17	nsLTP	Transportadora lípidos	8,5 y 11 kDa

El pistacho (*Pistacia vera* L.) y el anacardo (*Anacardium occidentale* L.) pertenecen a la familia *Anacardinaceae*, ambos frutos secos presentan reactividad cruzada¹, un fenómeno inmunológico por el cual un mismo anticuerpo IgE reconoce distintos antígenos que presentan alta homología estructural o identidad de secuencia²⁴. Según Costa et al.,²⁵ parece que la prevalencia de la alergia a pistacho está aumentando debido al aumento de su producción y consumo, siendo la Unión Europea el segundo mayor consumidor de pistacho después de Turquía. Hasta el momento, se han identificado y caracterizado cinco proteínas alergénicas en pistacho: Pis v 1 – Pis v5, siendo este último un alérgeno menor (Tabla 2)²⁶⁻²⁸. La alergia a anacardo supone un problema de salud significativo, varios estudios estadounidenses han descrito que es la segunda causa más común de alergia a fruto seco junto con la nuez, presentando una frecuencia del 20%²⁹. Además, las manifestaciones clínicas de la alergia a anacardo son a menudo reacciones anafilácticas graves e incluso peores que las del cacahuete³⁰. Hasta ahora, se han descrito tres proteínas alergénicas en el anacardo³¹⁻³³ (Tabla 3).

Tabla 2: Alérgenos alimentarios descritos en pistacho (*P. vera*)

Alérgeno	Tipo de proteína	Función	Peso molecular
Pis v 1	Albúmina 2S	Reserva	7 kDa
Pis v 2	Legumina 11S	Reserva	32 kDa
Pis v 3	Vicilina 7S	Reserva	55 kDa
Pis v 4	Superóxido dismutasa	Defensa	25,7 kDa
Pis v 5	Legumina 11S	Reserva	36 kDa

Tabla 3: Alérgenos alimentarios descritos en anacardo (*A. occidentale*)

Alérgeno	Tipo de proteína	Función	Peso molecular
Ana o 1	Vicilina 7S	Reserva	50 kDa
Ana o 2	Legumina 11S	Reserva	55 kDa
Ana o 3	Albúmina 2S	Reserva	14 kDa

La avellana (*Corylus avellana* L.) es un fruto seco que pertenece a la familia botánica *Betulaceae*. La alergia a avellana es la alergia más común en Europa y junto con la nuez también

lo es en España^{29,34}. Está implicada a menudo en reacciones de anafilaxia, aunque la mayoría de los sujetos alérgicos desarrollan síntomas leves³⁵. Se han identificado dos tipos de alergia a avellana, uno asociado a alergia alimentaria al fruto y otro causado por sensibilización a polen de abedul (también betulácea), aunque con frecuencia los pacientes son alérgicos a ambos^{36,37}. En la actualidad se han descrito y caracterizado nueve alérgenos alimentarios en avellana (Tabla 4). Algunos de los alérgenos que presentan reactividad cruzada con polen de abedul son Cor a 1 y Cor a 2. También es destacable Cor a 9, detectada en el 86% de los pacientes con alergia²⁹.

Tabla 4: Alérgenos alimentarios descritos en avellana (*C. avellana*)

Alérgeno	Tipo de proteína	Función	Peso molecular
Cor a 1	PR-10	Defensa	17 kDa
Cor a 2	Profilina	Regulación	14 kDa
Cor a 8	nsLTP	Transferencia lípidos	9 kDa
Cor a 9	Legumina 11S	Reserva	40 kDa
Cor a 11	Vicilina 7S	Reserva	48 kDa
Cor a 12 y 13	Oleosina	Estructural	17 y 15 kDa
Cor a 14	Albúmina 2S	Reserva	10 kDa
Cor a 15	Oleosina	Estructural	17kDa

La almendra (*Prunus dulcis* L.) es el fruto seco obtenido del almendro, perteneciente a la familia de las rosáceas (*Rosaceae*)³⁸. La alergia a almendra es la tercera alergia a fruto seco más común en Estados Unidos (reactiva en el 15% de los pacientes), detrás del anacardo y la nuez³⁹. Se han identificado y caracterizado varias proteínas alergénicas en almendra (Tabla 5): Pru du 1 (PR-10), Pru du 2 (TLP: proteína tipo taumatina), prolaminas Pru du 2S y Pru du 3 (albúmina 2S y LTP), Pru du 4 (profilina), Pru du 5 (60sRP: proteína ribosómica 60S) y las cupinas Pru du 6 y Pru du AP (legumina 11S y vicilina 7S, respectivamente)⁴⁰, recientemente, se han descubierto otras dos: Pru du 8 (proteína antimicrobiana) y Pru du 10 (MDL: enzima mandelonitrilo liasa)^{41,42}. Sin embargo, solo algunos de estos han sido probados para la reactividad con sueros alérgicos a almendra y están incluidos en la lista de alérgenos de la WHO-IUIS.

Tabla 5: Alérgenos alimentarios descritos en almendra (*P. dulcis*)

Alérgeno	Tipo de proteína	Función	Peso molecular
Pru du 1	PR-10	Defensa	17 kDa
Pru du 2	TLP	Taumatina	23 kDa
Pru du 2S	Albúmina 2S	Reserva	12 kDa
Pru du 3	nsLTP	Transferencia lípidos	9 kDa
Pru du 4	Profilina	Regulación	14 kDa
Pru du 5	60sRP	Estructural	10 kDa
Pru du 6	Legumina 11S	Reserva	360 kDa
Pru du AP	Vicilina 7S	Reserva	45 kDa
Pru du 8	Antimicrobiana	Defensa	31 kDa
Pru du 10	MDL	Regulación	60 kDa

1.4 Modificación de la capacidad alergénica de los alimentos

El procesado de alimentos es el conjunto de transformaciones físicas, químicas y biológicas desarrolladas en la industria para obtener alimentos aptos para el consumo o que presenten propiedades organolépticas y de textura mejoradas con respecto al material inicial⁴³. Muchos autores han documentado que el procesado de alimentos puede alterar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas: estructura, función, digestibilidad y solubilidad pueden verse alteradas, lo que podría alterar a su vez su inmunoreactividad. Todo proceso que modifique la estructura de una proteína puede interferir en la capacidad de unión de anticuerpos^{44,45}. El grado de alteración de la alergenicidad depende de muchos parámetros: método empleado, condiciones de procesado (tiempo, intensidad o ambiente), tipo de alimento y capacidad alergénica de este⁴⁶. No existen reglas fijas del efecto del procesado sobre la capacidad alergénica de los alimentos, pues, al igual que se pueden eliminar los epítomos existentes, pueden no alterarse o incluso generarse otros nuevos (neoalérgenos) de mayor potencia⁴⁶⁻⁴⁸.

Existen distintos tipos de procesado, el procesado térmico incluye cocción, horneado, fritura o tostado. La cocción genera cambios físicos en las proteínas: pérdida de estructura secundaria (55-70°C), ruptura de puentes disulfuro (70-80°C), formación de nuevas interacciones moleculares o de agregados (80-100°C) y, modificaciones químicas (>100°C)⁴⁵. Sin embargo, varios estudios han demostrado que la cocción tiene poco efecto en alérgenos de lentejas, garbanzos, judías verdes, guisantes, soja⁴⁶ o avellana⁴⁹, en anacardo y pistacho la cocción durante 60min causa una disminución de la desgranulación de basófilos⁵⁰. En cacahuets cocidos la reactividad media es 1,5 o 2 veces menor que en crudos o tostados, pues los alérgenos de bajo peso molecular (Ara h 2, Ara h 6 y Ara h 7) se transfieren al agua de cocción^{46,51}.

Otro tipo de procesado es el térmico y de presión como el aplicado con autoclave o la Despresurización instantánea controlada (DIC). El autoclave puede inducir cambios conformacionales en las proteínas: agregación o desnaturalización de estas, lo que reduce la capacidad de unión de IgE⁴⁶. En legumbres como lupino, lenteja, garbanzo⁴⁷ o cacahuete se reduce la unión a IgE con tratamientos a 2,8 atm, 138°C durante 15 o 30min, en el caso de cacahuete se observó que el peso molecular de las proteínas alergénicas se reducía, aunque Ara h 1 mantenía e incluso aumentaba su inmunoreactividad⁵². Este tratamiento también ha demostrado ser útil para este fin en pistacho y anacardo que, tratados a 2,56 atm, 138°C, 30min mostraron una reducción en la unión de IgE. La avellana tratada a esas condiciones reveló un cambio en el patrón proteico con respecto al fruto sin tratar y una reducción de la intensidad de

bandas⁴⁹. En el tratamiento DIC, se aplican altas presiones (hasta 8 bares) y altas temperaturas (hasta 180°C), durante tiempos cortos de tiempo lo que evita el daño causado por calor (de segundos a pocos minutos), seguido de una bajada instantánea de la presión^{53,54}. Este método ha demostrado reducir la inmunoreactividad de IgE tan eficazmente como los tratamientos más duros de autoclave en soja, garbanzo y lenteja tratados a 6 bares 120 segundos^{55,56}, observándose una reducción notable en el caso de la soja; en el caso de cacahuete tratado a esas mismas condiciones se observó un mayor efecto sobre las proteínas de cacahuete tostado que crudo⁵⁵, en pistacho y anacardo tratados a 7bar 120s se observan resultados similares⁵⁷.

También existe el procesado no térmico: altas presiones hidrostáticas (HHP), ultrasonidos, campo eléctrico pulsado o tratamiento enzimático. Una de las ventajas que presentan es que mantienen la calidad sensorial y nutricional a la vez que alteran la alergenicidad⁵. La tecnología HHP es un tratamiento no térmico capaz de inactivar patógenos a temperatura ambiente aplicando altas presiones (100MPa-1GPa)⁵⁸. Afecta a los enlaces no covalentes como enlaces de hidrógeno, iónicos e hidrófobos presentes en la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, por tanto, es una herramienta potencial en la modificación alergénica^{59,60}. Sin embargo, este tratamiento por sí solo es poco efectivo y para dicha finalidad se recomienda su uso en combinación con hidrólisis enzimática o tratamiento térmico⁵⁹. Existen varios estudios sobre el efecto de las HHP en frutos secos: Ara h 2 aislado de cacahuete y tratado a 180MPa redujo su alergenicidad al cambiar su estructura secundaria⁶¹; el tratamiento de avellana a 600MPa durante 15min produjo una alteración en la solubilidad de sus proteínas⁶². La digestión enzimática es capaz de destruir epítomos lineales de alérgenos y su eficacia depende de las condiciones del proceso (pH, temperatura, relación enzima-sustrato, tiempo). Se conoce que el empleo de múltiples enzimas o la combinación con calor, mejora la proteólisis⁵. Actualmente está disponible en el mercado leche de vaca hidrolizada con endo y exoproteasas para consumo en individuos alérgicos⁶³, se ha demostrado que la combinación de hidrólisis enzimática, sonicación y tratamiento térmico es eficaz para reducir o incluso abolir la alergenicidad de anacardo y pistacho⁶⁴. Lenteja sometida a hidrólisis secuencial con una exo y endoproteasa provoca la destrucción proteolítica de epítomos alergénicos⁶⁵, la hidrólisis de cacahuete tostado con esas mismas enzimas reduce su inmunoreactividad, siendo la endoproteasa la que tiene un efecto más pronunciado⁶⁶. Además, varios estudios han probado la susceptibilidad de alérgenos alimentarios a la digestión gastrointestinal y el efecto de ésta sobre la alergenicidad mediante la simulación de condiciones fisiológicas digestivas¹⁰. Un ejemplo es la reducción de la alergenicidad de proteínas de gamba mediante digestión gástrica *in vitro*⁶⁷.

2. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo general del presente trabajo consiste en estudiar la capacidad alergénica en frutos secos y el efecto del procesado tecnológico sobre su potencial alergénico, con la finalidad de analizar la modificación de su inmunoreactividad. Como se muestra en el plan de trabajo (Fig. 3), los frutos secos estudiados fueron: cacahuete, pistacho, anacardo, avellana y almendra; y los tratamientos tecnológicos utilizados: cocción 60 minutos, autoclave a distintas condiciones de presión y tiempo, Despresurización Instantánea Controlada a 7 bares, 120 segundos, altas presiones hidrostáticas (300-600MPa) y tratamiento enzimático con proteasas comerciales.

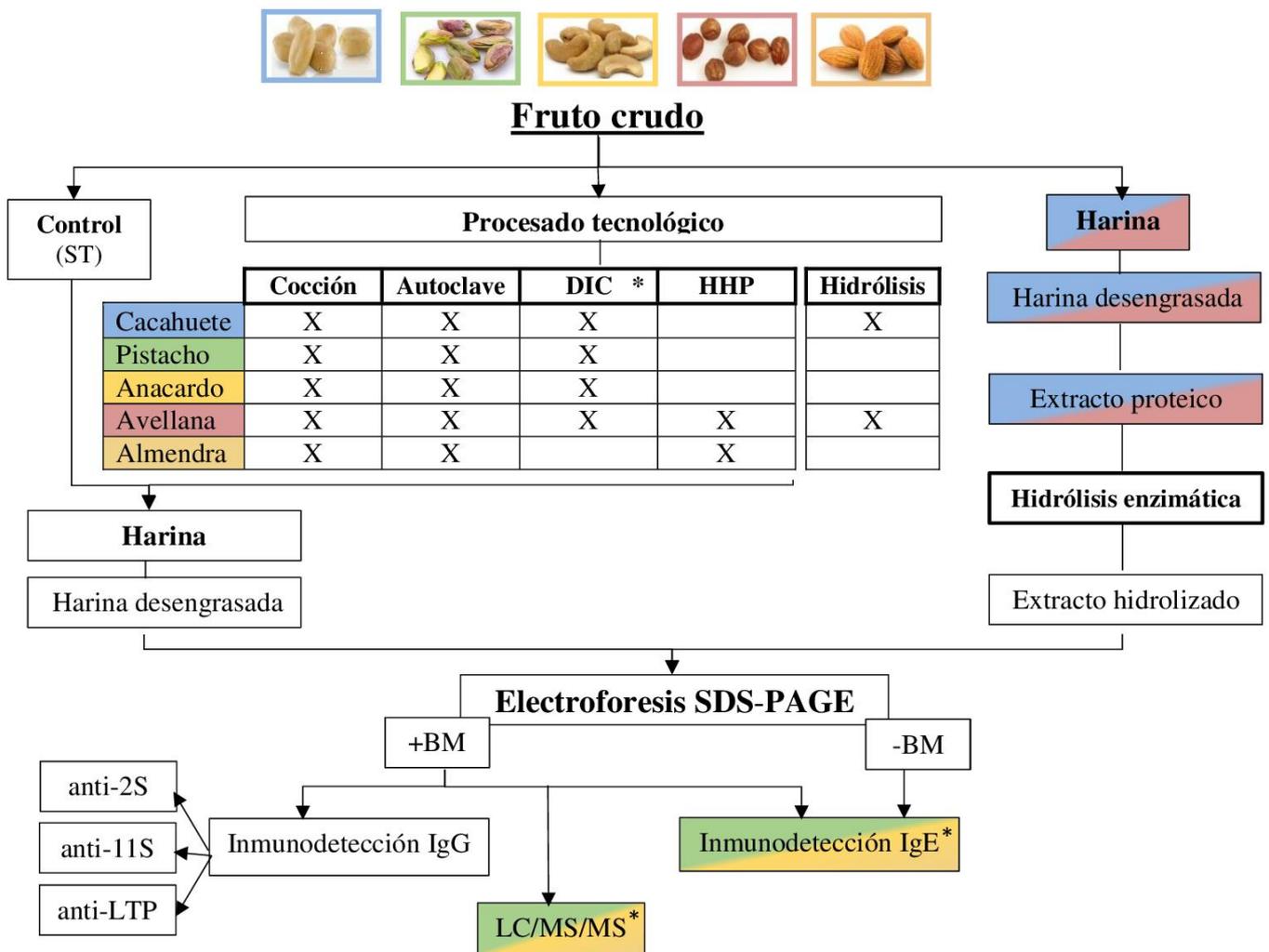


Figura 3: Plan experimental esquematizado. +BM, Condiciones reductoras con BME; -BM, Condiciones nativas sin BME; *, muestras tratadas con DIC.

Para la consecución de estos objetivos generales, se definen los siguientes objetivos específicos:

- Estudiar la influencia del tratamiento térmico y de presión (cocción, HHP, autoclave y DIC), comparando su perfil electroforético con el de muestras control (sin tratar).

- Selección de los tratamientos enzimáticos con proteasas comerciales más efectivos para modificar el perfil proteico en cacahuete y avellana.
- Evaluación de la modificación del potencial alergénico tras los tratamientos térmicos y de presión, mediante la inmunodetección con anticuerpos IgG anti-2S, anti-11S y anti-LTP.
- Análisis de la modificación de la reactividad de proteínas alergénicas de pistacho y anacardo tratadas con DIC, mediante la inmunodetección con anticuerpos IgE de sueros de pacientes sensibilizados a ambos frutos secos.
- Estudio proteómico de la influencia de DIC sobre alérgenos de pistacho y anacardo mediante LC/MS/MS.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetal

En este trabajo se utilizaron frutos de anacardo (*A. occidentale* L. tipo 320 de origen India) y cacahuete (*A. hypogaea* L. de origen China), ambos procedentes de Productos Manzanares S.L. (Cuenca); Pistacho (*P. vera* L. var. Kerman), almendra (*P. dulcis* L. var. Marcona) y avellana (*C. avellana* L. var. Negreta) se obtuvieron del banco de germoplasma del IRTA Mas Bover (Institute of Agrifood Research Techonology, Tarragona).

3.2 Tratamientos térmicos y de presión

Los frutos se sometieron a distintos tratamientos térmicos, de presión o a una combinación de ambos. Los cinco frutos secos se sometieron a cocción durante 60min (C60) y autoclave húmedo (Tactrol 2, Priorclave) a 121°C/118 kPa durante 30min (AU1) y a 138°C/256 kPa durante 30min (AU2). Los tratamientos se realizaron en agua destilada proporción 1:5 (p/v), tras lo cual se congelaron y liofilizaron (LyoQuest, Telstar). Todos los frutos menos almendra se sometieron a Despresurización Instantánea Controlada (DIC) realizada en la Universidad de la Rochelle (Laboratoire Maîtrise des Technologies Agro-Industrielles, La Rochelle, Francia) a 7bar, 120s y 165°C (DIC7). Los frutos procesados y sus respectivos controles (ST, C60, AU1, AU2 y DIC7) se trituraron usando un robot de cocina Thermomix (Vorkwek), obteniéndose harinas. Las harinas se desengrasaron con n-hexano (95%) en proporción 34ml/g harina, durante 4h en agitación, después, se dejó reposar 16h, se filtró y se dejó secar, se tamizaron a través de una malla de 1mm para utilizarse en los posteriores experimentos. En el tratamiento

con HHP se emplearon harinas de avellana y almendra, previamente molidas en Thermomix y desengrasadas con n-hexano (34ml/g harina), durante 4h en agitación y secadas tras la filtración. Las condiciones experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con Omi et al.⁶⁸ y Kato et al.⁶⁹: las harinas desengrasadas se disolvieron en agua destilada (1:4 p/v) durante 20h y después se sometieron a HHP (300, 400, 500 y 600 MPa durante 15min a 20°C en un equipo de alta presión (ACB Pressure System-Alstom Hyperbar, Francia).

3.3 Extracción de proteínas de frutos secos

Se realizó una extracción proteica en las harinas de cacahuete y avellana ST para seleccionar el tratamiento enzimático más efectivo para cada fruto seco. La harina ST desengrasada se solubilizó (1:10, p/v) en buffer BSB en avellana (Borate Buffered Saline, 0,1 M H₃BO₃, 0,025 M Na₂B₄O₇, 0,075M NaCl y 1%PVP, pH 8,4) y en buffer TRIS-HCl en cacahuete (Tris(hidroximetil)aminometano Hidrocloruro, 0,05M Tris-HCl, 0,5N NaCl, pH 8). Después, se agitaron durante 1h a 4°C y se centrifugaron (Varifuge 20RS, Heraeus) a 27419g a 4°C durante 30min (avellana) o 20min (cacahuete), en el caso de cacahuete este paso se repitió una segunda vez. El pellet se descartó y el sobrenadante se dializó en membranas con un tamaño de exclusión de 3.500Da (Membra-Cel Dialysis Membranes, Serva), durante 24 h a 4°C y agitación, frente a agua destilada, posteriormente, se congeló y liofilizó (LyoQuest, Telstar).

3.4 Tratamiento enzimático

Siete proteasas de tipo alimenticio denominadas E1-E7 (Amano Enzyme Europe Ltd., Agno, Suiza) se analizaron para la optimización de la hidrólisis enzimática de muestras de avellana y cacahuete: E1 - Thermoase PC10F (endoproteasa), E2 - ProteAX (exoproteasa), E3 - Protin SD-NY10 (patentada), E4 - Peptidase R (exopeptidasa), E5 - Protin SD-AY10 (similar a alcalasa), E6 - Proteasa M "Amano" 6SD (patentada) y E7 - Proteasa P "Amano" 3SD (patentada). Los extractos de avellana y cacahuete sin tratar (ST) se solubilizaron al 0,8% (p/v) en tampón BSB o TRIS-HCl (1:10, p/v) y se incubaron en termobloque (Block Heater BBA, Grant Boekel) a 55°C durante 19h, tomando muestra en distintos puntos de tiempo (0, 1, 2, 3 y 19h), para parar la reacción enzimática se metieron en hielo. Se analizó el perfil electroforético de las muestras tratadas con cada una de las enzimas (E1-E7) y a los 5 tiempos (0-19h) para seleccionar las enzimas más efectivas en la degradación proteica (mayor reducción de número e intensidad de bandas proteicas) para aplicarlo sobre pasta de harina de cada fruto seco.

Para la realización del tratamiento enzimático se prepara una pasta de avellana y cacahuete, mezclando las harinas desengrasadas a analizar (ST, C60, AU2 y DIC7) con agua destilada (0,5g/ml). A cada una de las pastas se les añade 110µL de las enzimas proteasas seleccionadas en el apartado anterior diluidas 1:2 en agua destilada. Las pastas se incuban con dichas enzimas a 55°C en baño 1h y se analizan mediante SDS-PAGE y Western-Blot.

3.5 Análisis electroforético

Las harinas de los frutos secos con sus respectivos tratamientos se analizaron mediante electroforesis. El sistema electroforético utilizado fue geles de poliacrilamida prefabricados de gradiente lineal 4-20% (Miniprotean, BioRad) y tampón de electroforesis Tris-Glicina-SDS (BioRad). Las harinas desengrasadas sin tratar y tratadas se solubilizaron al 0,8% (p/v) en tampón de carga Laemmli (BioRad) con o sin BM (β -mercaptoetanol) en función de si se emplean condiciones reductoras (+BM) o nativas (-BM). Después, las muestras se calentaron en termobloque (Block Heater BBA, Grant Boekel) a 95°C, durante 5min y se centrifugaron a 15871g durante 5min (Centrifuge 5424 R, Eppendorf). Los extractos de avellana y cacahuete tratados con las enzimas E1-E7 también se solubilizaron al 0,8% (p/v) en tampón de carga con BM y las condiciones fueron 65°C, durante 15min, y centrífuga a 15871g durante 15s. Tras esto, se cargaron en los pocillos del gel (20µg proteína/carril) junto con el marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standard Dual Color (BioRad) (P+). Las condiciones de electroforesis fueron voltaje constante 200V, durante aproximadamente 45min. Finalmente, los geles se tiñieron 30min en agitación con azul Coomassie al 0,26%, y se destiñeron tras varios lavados con solución de desteñido (20% metanol, 7,5% ácido acético). El escaneado se realizó con un densitómetro (GS-800, BioRad) y el análisis de imagen con el programa Quantity One (BioRad), que permite asignar el peso molecular de las bandas proteicas separadas en el gel.

3.6 Caracterización de sueros

Las muestras de suero empleadas fueron de pacientes alérgicos a pistacho y anacardo seleccionadas del Servicio de Alergia del Hospital La Paz de Madrid. Se realizó una determinación del título de anticuerpos IgE específicos frente a ambos frutos secos por el método CAP-FEIA⁷⁰. El criterio de selección fue un nivel de IgE específica superior o igual a 0,35 kU/l. Se eligieron sueros individuales de 11 pacientes, cuyos valores de IgE oscilaban entre 15,4 - >100kU/l en pistacho y 10,1 - >100kU/l para anacardo (Tabla 6).

Tabla 6: Datos inmunológicos y clínicos de los 11 sueros de pacientes sensibilizados a pistacho y anacardo seleccionados

Paciente	Edad/ Sexo	Pistacho (kU/l)	Anacardo (Ku/l)	Síntomas
1	9/H	>100	>100	Anafilaxia
2	19/M	>100	>100	SSIP
3	6/M	71	70,1	SSIP
4	10/H	76,2	75,4	Edema en lengua
5	4/H	74,4	74,5	SSIP
6	5/H	33,2	39,9	Urticaria, edema palpebral, tos y afonía
7	11/M	16,4	10,1	SSIP
8	7/M	15,4	10,6	SSIP*
9	5/M	29,3	23,4	Purito orofaríngeo y lingual
10	7/M	19,9	13,1	Anafilaxia
11	6/M	18,0	11,3	Urticaria, edema palpebral y de párpado

SSIP, Sensibilización sin ingesta previa; *, sin acceso a informe

3.7 Inmunodetección

3.7.1 Inmunodetección con IgG: Tras la electroforesis en gel SDS-PAGE (4-20%) se realizó una transferencia a membrana siguiendo el método descrito por Cuadrado et al.⁶⁴ con modificaciones. Los geles se transfirieron a una membrana de PVDF (Polyvinylidene Difluoride, Immobilon P) mediante un sistema semiseco (iBlot 2Dry Blotting System, Invitrogen), durante 7min a 20V. El bloqueo de las membranas se realizó con leche en polvo desnatada (3%) en tampón PBST (Phosphate Buffered Saline 10mM, pH 1,4, 0,05% Tween 20), durante 30min a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se incubó durante una hora en agitación y temperatura ambiente con el anticuerpo IgG primario diluido en solución de bloqueo 1/10 en PBS anti-11S (1:10000), anti-2S (1:25000) y anti-LTP (1:500). Tras la incubación la membrana se lavó tres veces con PBST en agitación, después se incubó durante 1h en agitación con el anticuerpo secundario (Anti-Rabbit IgG Alkaline Phosphatase, Sigma) diluido 1:5000 en solución de bloqueo a ¼ en PBS, después, la membrana se volvió a lavar tres veces con PBST en agitación. La membrana se reveló incubando en oscuridad con el sustrato BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate/nitro blue tetrazolium, Sigma). La reacción se detuvo con agua destilada y la membrana se escaneó en un equipo ChemiDoc (BioRad) y las imágenes se analizaron con el programa ImageLab (BioRad).

3.7.2 Inmunodetección con IgE de sueros humanos: Tras la electroforesis, los geles de pistacho y anacardo tratados con DIC se transfirieron a membrana de PVDF (Immobilon) a 20V, 7min, utilizando para ello el mismo sistema de transferencia semiseco. Finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó con solución de bloqueo 2% de leche en polvo desengrasada en PBST

durante 30 minutos en agitación. Para eliminar el exceso de solución de bloqueo, las membranas se lavaron tres veces durante 5min en PBST. A continuación, las membranas se incubaron con los 11 sueros individuales (dilución 1:10 o 1:20 en PBST), durante 16h, a 4°C y en agitación. Después, se lavaron tres veces con PBST y se incubaron con el anticuerpo secundario (Mouse Anti-Human IgE Fc-HRP, SouthernBiotech) diluido 1:10000 en solución de bloqueo al 2% y solución DynaLight™ 1:62500 (Precision protein Strep Tractin-HRP Conjugate, Invitrogen). Las membranas se lavaron tres veces con PBST y se dio un último lavado con PBS. En este caso se utilizó quimioluminiscencia para el revelado de la membrana. Como sustrato se utilizó el sustrato Pierce™ ECL 2 (Thermo SCIENTIFIC) en las condiciones indicadas por el fabricante. La membrana se escaneó también en ChemiDoc (BioRad) y las imágenes se analizaron con el software ImageLab (BioRad) a distintos tiempos de exposición.

3.8 Identificación de proteínas mediante Espectrometría de Masas

Las proteínas inmunorreactivas de pistacho y anacardo, sin procesar y tratadas con el tratamiento más drástico de DIC (7 bar, 120 s), se analizaron mediante Espectrometría de Masas. Para ello, las bandas de interés se cortaron manualmente del gel SDS-PAGE, se redujeron con DTT 10mM (Dithiothreitol) en bicarbonato de amonio 25mM (pH 8,5) durante 30min a 56°C, posteriormente se alquilaron con Iodoacetamida 25mM en bicarbonato de amonio 25mM en oscuridad durante 15min, finalmente las muestras se digirieron con TRYP SEQ-RO (tripsina Sequencing Grade de páncreas bovino, Roche) diluida al 1,25% en bicarbonato de amonio 25mM durante 16h a 37°C. Tras la digestión, se recogió el sobrenadante y se colocó 1µl en la placa del MALDI-TOF y se dejó secar al aire, después, se cocristalizó con 0,7µl de ácido α -Ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) diluido 3:1 (p/v) en acetonitrilo al 50% y se volvió a dejar secar al aire. Los análisis de MALDI-TOF se realizaron en un espectrómetro de masas MALDI-TOF / TOF 4800 Plus Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, MDS SCIEX) en la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense de Madrid, el modo de operación fue: calibración interna utilizando la relación masa/carga (m/z) de los péptidos resultantes de la digestión de tripsina, reflector modo positivo y voltaje 20000V. De esta forma se obtienen las huellas dactilares de masa peptídica (PMF: Peptide Mass Fingerprinting), aquellas con una relación señal/ruido superior a 10 se seleccionaron y sus pesos moleculares se compararon con las masas de digestión de tripsina anotadas en bases de datos de proteínas. Las proteínas identificadas por PMF se sometieron a un análisis de secuenciación MS/MS, para ello se realizó una fragmentación mediante CID (Collision-induced dissociation) usando gas

atmosférico, reflector de iones de 1Kv y ventana de selección de +/- 4Da. El modelo de placa y la calibración predeterminada se optimizaron para el procesamiento de espectros MS-MS. Para la identificación de proteínas, se usó la base de datos Allergome 20,200,317 (4402 secuencias; 1,236,229 residuos) sin restricción de taxonomía usando MASCOT 2.3 (www.matrixscience.com) a través del software Global Protein Server (GPS) v.3.6 (AB Sciex). Los parámetros de búsqueda de MASCOT fueron: (1) Carbamidometil cisteína (C) como modificación fija y Oxidación metionina (M) como modificación variable; (2) tolerancia de masa peptídica: 50 ppm (PMF) - 100 ppm (MSMS o búsqueda combinada); (3) sitios de escisión de tripsina permitidos: 1; (4) Tolerancia de fragmentos MS/MS, 0.3 Da.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la capacidad alergénica de distintos frutos secos (pistacho, anacardo, cacahuete, avellana y almendra), tanto control (sin tratamiento) como sometidos a distintos tipos de procesado tecnológico: tratamiento térmico (cocción), tratamiento a presión (HHP), combinación de ambos (autoclave y DIC) e hidrólisis enzimática. La finalidad es analizar el efecto de este procesado en su perfil proteico y en su potencial alergénico, puesto que, el procesado de los alimentos es capaz de modificar la capacidad alergénica al alterar las propiedades fisicoquímicas de las proteínas^{43,71}.

4.1 Análisis electroforético, inmunodetección en muestras de cacahuete y selección enzimática

Con la finalidad de determinar el efecto del procesado sobre el potencial alergénico de cacahuete, se obtuvo el perfil electroforético y se desarrolló un estudio de inmunoreactividad para muestras de este fruto seco tratadas con distintos métodos de procesado, uno basado únicamente en la aplicación de calor húmedo (cocción 60min: C60) y varios combinando calor con distintas presiones: autoclave 121°C, 30min (AU1) y 138°C, 30min (AU2) y DIC 7bar 120s (DIC7) un tratamiento térmico y de presión que presenta diversas ventajas con respecto al autoclave como son: alcance de mayores presiones con menores tiempos de tratamiento, lo que provocaría menor daño por calor⁷². Para el estudio de inmunoreactividad se emplearon anticuerpos IgG anti-2S, anti-11S y anti-LTP, debido a que la mayoría de los alérgenos alimentarios vegetales pertenecen a pocas familias, entre las que destacan las proteínas de almacenamiento de semillas leguminas 11S (superfamilia cupina), albúmina 2S y proteínas de

transferencia de lípidos inespecíficas nsLTP (superfamilia prolamina)¹⁷. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.

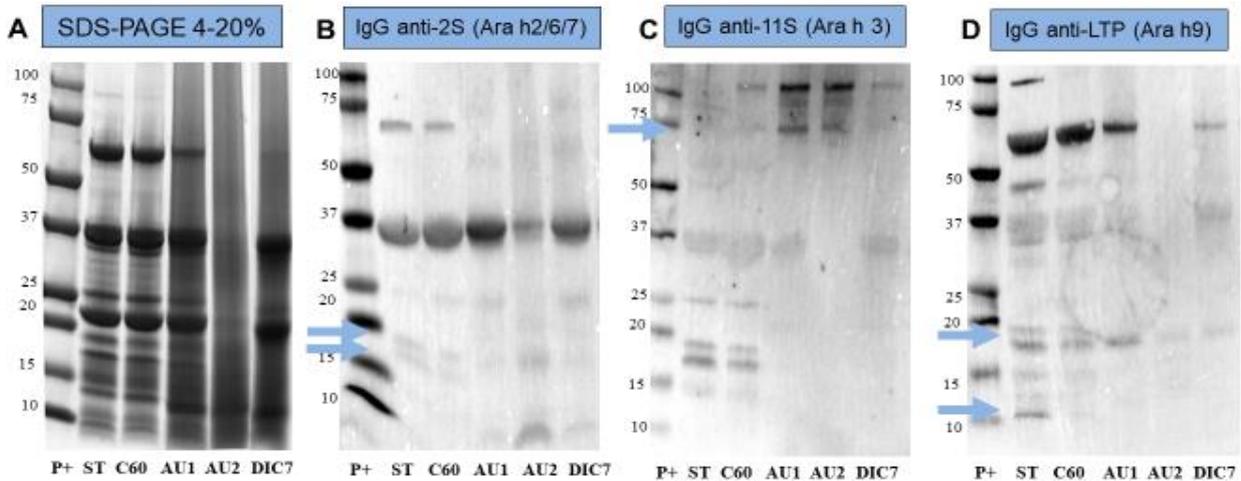


Figura 4: SDS-PAGE (4-20%) de cacahuete (20µg proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan los posibles alérgenos detectados.

En la Figura 4.A se muestra el análisis electroforético de harinas de cacahuete control (ST) y sus respectivos tratamientos. El patrón de bandas abarca un alto número de pesos moleculares, las bandas más intensas se localizan entorno a los 22, 37 y 65kDa. Respecto a las bandas menos intensas, la mayoría se localiza entre los 10 y los 20kDa, pudiendo corresponderse alguna de ellas con las proteínas alergénicas de cacahuete de menor peso molecular como son las nsLTP Ara h 9, 16 y 17 (17, 8,5 y 11kDa), oleosinas Ara h 10, 11, 14 y 15 (16, 14, 12,5 y 17 kDa), profilina Ara h 5 y albúminas 2S Ara h 6 y 7, todas ellas de 15kDa.

Estudios previos han demostrado que el consumo de cacahuete hervido (consumido usualmente en China) genera una menor prevalencia que el consumo de cacahuete frito (típicamente consumido en Estados Unidos)⁷³, lo que podría asociarse con una disminución de su capacidad alergénica durante la cocción. Varios investigadores, han demostrado mediante el uso de sueros de pacientes alérgicos que, el cacahuete cocido genera una menor inmunoreactividad, aunque los pacientes si reconocían proteínas presentes en el agua de cocción, debido a que alérgenos de este fruto seco se filtran al agua durante este procesado⁶⁴. A diferencia de estos resultados y como se observa en la electroforesis de la Figura 4.A, la cocción durante 60min (C60) no afecta a las proteínas de cacahuete, pues se observa un patrón de bandas casi idéntico al del control. El tratamiento con autoclave y DIC sí genera diferencias con respecto al control, sobre todo en el tratamiento más drástico de autoclave a 138°C, 30min (AU2), en el que se observa una drástica fragmentación proteica, lo que implica una fuerte reducción en el número e intensidad de bandas. Estos datos, se corresponden con lo descrito por otros autores, Cabanillas et al.⁵²

estudiaron el efecto de distintas condiciones de autoclave en semillas de cacahuete crudo, tostado y frito, observando que el tratamiento 121°C, 30min reducía levemente la intensidad de bandas y que el tratamiento más drástico (138°C, 30min) generaba una reducción mucho más marcada. La reducción generada por DIC7 no es tan destacable como la obtenida tras AU2, sino que se asemejan más a los de AU1, aunque son destacables las ventajas que presenta este tratamiento, enunciadas anteriormente de acuerdo con resultados previos⁵⁵.

La inmunodetección con anticuerpos IgG se muestra en las Figuras 4.B, 4.C y 4D (anti-2S, anti-11S y anti-LTP, respectivamente). En el caso de cacahuete se han registrado hasta la actualidad tres albúminas 2S: Ara h 2 (17kDa) y Ara h 6 y 7 (15kDa cada una) detectadas en el WB anti-2S. Destacan, además, las bandas localizadas en torno a los 37 y 70kDa, aunque no se corresponden con ninguna proteína descrita en cacahuete. Las bandas correspondientes con las albúminas 2S siguen estando presentes en el tratamiento de C60; el tratamiento más débil de autoclave (AU1) es capaz de eliminarlas; en AU2 la banda de 37kDa no llega a desaparecer, pero si se reduce significativamente, aparece, además, una banda de bajo peso molecular (10-15kDa) que se podría corresponder con un producto de degradación; tras el tratamiento DIC7 se obtienen resultados similares a los obtenidos en AU1. Los resultados de la incubación con el anticuerpo IgG anti-11S, muestran la presencia de varias proteínas de alto peso molecular (75-100kDa), en el caso de cacahuete sólo se ha descrito la legumina 11S Ara h 3, marcada con una flecha azul. Estas bandas son inmunoreactivas en todos los tratamientos, incluido AU2, aunque en este destaca la eliminación total de reactividad de bandas de menor peso (15-25kDa). Las LTP son proteínas de 9 a 10kDa pertenecientes a una familia multigénica, sin embargo, se ha demostrado que Ara h 9 presenta 2 isoformas de 21 y 10,5kDa (Ara h 9.0101 y Ara h 9.0201) siendo ambas inmunoreactivas⁷⁴. En la inmunodetección con anti-LTP se detectan bandas proteicas a lo largo de toda la membrana. En cacahuete sólo se han descrito tres proteínas LTP hasta la fecha (Ara h 9, 16 y 17, estas dos últimas de 8,5 y 11kDa), pudiendo ser alguna de ellas compatibles con la banda de 10kDa observada en el WB y la banda de entorno a 20kDa con la isoforma de mayor peso molecular de Ara h 9 (ambas señaladas). En este caso el procesado genera un efecto apreciable incluso en el tratamiento más débil, en el que se eliminan algunas de las bandas y se reduce la intensidad de otras a excepción de una localizada en torno a los 65kDa, que sólo se elimina en el tratamiento más drástico AU2 y se reduce significativamente tras el tratamiento DIC7. Respecto al tratamiento con autoclave, a medida que se aumenta la presión y temperatura el número de bandas se va reduciendo hasta casi abolirse en AU2.

Con la finalidad de conocer el efecto de la combinación del tratamiento térmico y/o de presión (cocción, autoclave y DIC) con hidrólisis enzimática en cacahuete, el primer paso es la selección de enzimas proteolíticas más efectivas en el tratamiento de dicho fruto seco. Para ello, se analizó la capacidad de digestión proteica mediante la reducción de número o intensidad de bandas en un gel de electroforesis SDS-PAGE tras el tratamiento de extractos de cacahuete control (ST) con 7 enzimas (E1-E7), durante distintos tiempos de tratamiento, desde 0h en el primer carril hasta 19h en el último. El resultado de dicho tratamiento se muestra en la Figura 4. En estudios previos de Cuadrado et al.⁶⁴ se analizó el efecto de esas mismas proteasas en la digestión de harinas de pistacho y anacardo, todas fueron recomendadas por Amano por su potencial para digerir proteínas alergénicas, sin embargo, ninguna de las tres primeras (E1-E3) fue suficientemente eficaz en la reducción de inmunoreactividad: en el caso de anacardo se seleccionó E7 durante 2h de sonicación, aunque algunos de sus principales alérgenos seguían detectándose, siendo necesaria la combinación con tratamiento térmico. En el caso de pistacho, la alergenicidad fue casi abolida tras la digestión durante 1h de sonicación con la enzima E5.

Los resultados observados en cacahuete permiten deducir que el patrón proteico, es decir, la distribución de las bandas a lo largo del gel varía en función de la enzima utilizada: E1 y E7 (Fig. 5.A y 5.G) generan un patrón similar, ambas son capaces de eliminar las proteínas de mayor peso molecular, siendo más eficaz E7. El tratamiento con la enzima E3 (Fig. 5.C) genera un patrón similar al de E1 y E7, aunque es capaz de eliminar un mayor número de bandas de entorno a los 15 y 25kDa, además de reducir eficazmente su intensidad. El tratamiento más eficaz es el de E5 (enzima de tipo alcalasa) en el que incluso en el menor tiempo de tratamiento (1h) se eliminan casi al completo todas las proteínas a excepción de una de bajo peso molecular, en la que se reduce la intensidad con respecto al control (0h) (Fig. 5.E). Estudios previos de Cabanillas et al.⁶⁶, también destacaron que el tratamiento con Alcalasa no mostraba proteínas detectables en SDS-PAGE. Shi et al.,⁷⁵ también observaron que la digestión enzimática con Alcalasa procedente de *Bacillus licheniformis*, reducía la capacidad alergénica en extractos de cacahuete. Respecto al efecto del tiempo, es destacable que no es un parámetro que influya drásticamente en la reducción de número e intensidad de bandas, pues entre los tiempos 1h, 2h y 3h (carriles 2-4) no existe a penas diferencia, en el que sí se observa más efecto es en el tiempo más largo 19h (carril 5 del gel). Por tanto, en cacahuete se seleccionarán las enzimas E3 (Protin SD-NY10) y E5 (Protin SD- AY10) durante un tiempo de tratamiento de 1h para posteriores análisis.

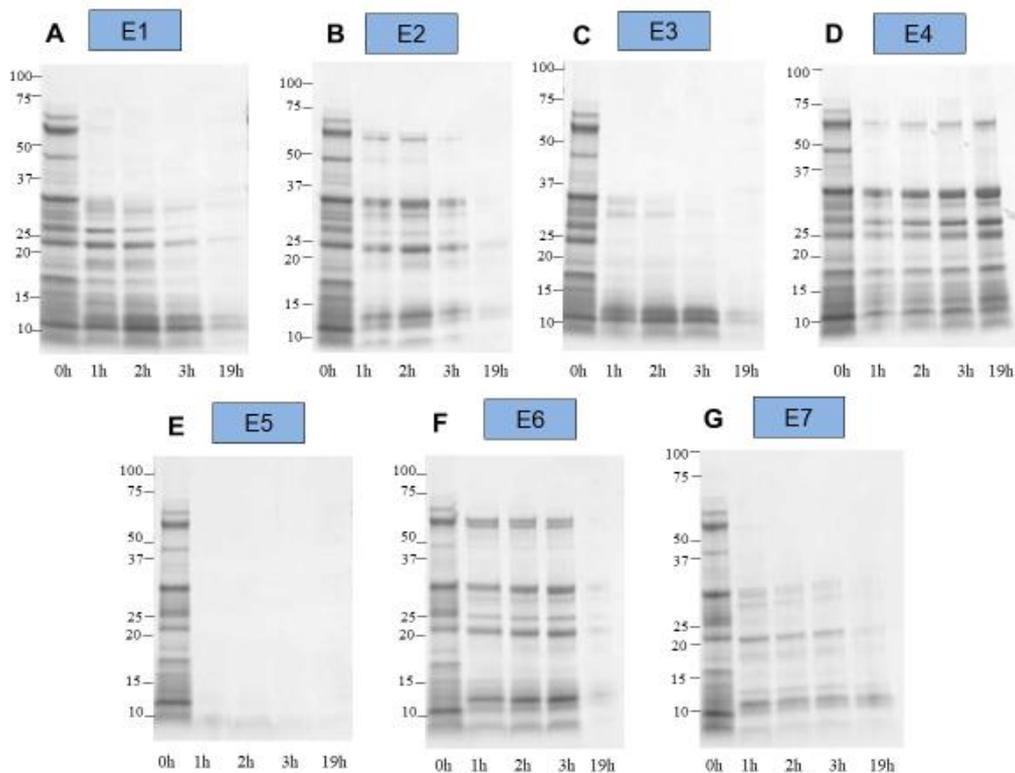


Figura 5: SDS-PAGE (4-20%) de cacahuete (20µg proteína/carril) de muestras control (0h) y tratadas con enzimas E1-E7 (A-G) a distintos tiempos (1-19h).

4.2 Análisis electroforético e inmunodetección en muestras de pistacho

Al igual que en cacahuete, en pistacho se obtuvo el perfil electroforético y se llevó a cabo la inmunodetección con los mismos anticuerpos IgG anti-2S, anti-11S y anti-LTP de los tratamientos C60, AU1, AU2 y DIC7. Estos cuatro tratamientos se analizaron con los anticuerpos IgG a excepción de anti-LTP en el que solo se analizó cocción y autoclave.

En la Fig. 6.A se muestra la electroforesis de harinas de pistacho control y tratadas, las bandas más intensas se localizan en torno a los 10-15kDa y los 20-37kDa. La banda de menor peso molecular podría corresponderse con Pis v 1 (9kDa), y las dos por encima de esta y por debajo de 37kDa serían compatibles con las leguminas 11S Pis v 2 y Pis v 5 de 32 y 36kDa respectivamente. Respecto al efecto del tratamiento más débil (C60), al igual que ocurría en cacahuete no se observa apenas variación con respecto al control. En el caso del autoclave el número e intensidad de bandas disminuye a medida que las condiciones de tratamiento se hacen más drásticas (mayor presión y temperatura), observándose mayor diferencia en AU2 (138°C, 30 min) en la que se eliminan las bandas proteicas casi al completo. Estudios recientes de Sanchiz et al.⁵⁰ en los que se analiza el efecto de cocción y tratamientos de calor y presión, concluyen que el procesado con autoclave a 138°C, 30min es el más eficiente para disminuir

las propiedades alergénicas, al reducirse la unión de IgE y la degranulación de basófilos, alcanzando valores similares al del control negativo. El tratamiento DIC para la reducción de capacidad alergénica en frutos secos no ha sido muy estudiado, trabajos de Guillamón et al,⁷⁶ y Cuadrado et al.⁵⁵ en los que se estudió el efecto de DIC a 3bar y 6bar durante 1 y 3min en harinas de distintas especies vegetales (altramuz, garbanzo, lenteja, soja y cacahuete), mostraron que la cantidad de alérgeno se reducía aunque, a penas se observaron cambios entre tratamientos, lo que lleva a deducir que condiciones de DIC7 podrían ser favorables en la disminución de alergenicidad. En dicho tratamiento, cabe destacar que se generan cambios significativos con respecto al control, siendo estos más marcados que el tratamiento AU1 (reduce más la intensidad de banda), pero sin llegar al efecto que genera AU2.

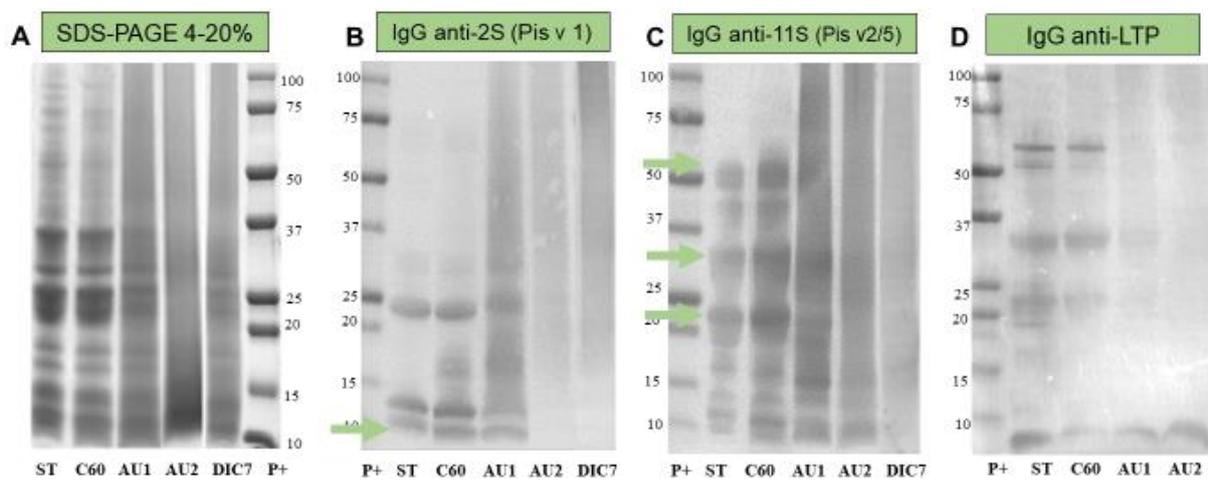


Figura 6: SDS-PAGE (4-20%) de pistacho (20µg proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan la posición de posibles alérgenos.

En la Fig. 6.B se muestra la inmunodetección con el anticuerpo IgG anti-2S en harinas de pistacho control y tratadas. Se aprecia la unión del anticuerpo a bandas de bajo peso molecular. Aparece señalada la banda localizada en la zona de 10kDa que podría corresponderse con Pis v 1 (7kDa), esta banda sigue estando presente en el tratamiento C60 y en el más débil de autoclave (AU1), mientras que en AU2 y DIC7 se reduce su intensidad llegando a desaparecer. La inmunodetección de leguminas 11S se muestra en la Fig. 6.C, esta familia de proteínas está formada por dos subunidades, una ácida (α) de 30-40kDa y otra básica (β) de unos 20^{29,77}. En esta figura se aprecia la unión del anticuerpo a proteínas de distintos pesos moleculares, destacan tres bandas de 50, 30 y 20kDa, compatibles con las proteínas legumina 11S Pis v 2 y Pis v 5 intacta y sus respectivas subunidades ácida y básica, respectivamente. El tratamiento más eficaz en este caso es el de DIC7 pues es en el que se eliminan mayor número de bandas y en mayor intensidad, respecto a los otros tres tratamientos, el efecto es más pronunciado a medida que las condiciones se endurecen de tal forma que C60 a penas genera cambios con

respecto al control, AU1 es capaz de eliminar algunas bandas y AU2 reduce la intensidad de las mismas hasta casi su eliminación total a excepción de algunas de bajo peso molecular. El WB con anti-LTP aparece en la Fig. 6.D, en el caso de pistacho hasta la fecha no se han descrito proteínas de este tipo como alergénicas, sin embargo se detectan varias bandas de 60, 30 20 y 10kDa, estas bandas siguen estando presentes en el tratamiento de cocción 60min; en los dos tratamientos con autoclave se eliminan las proteínas de mayor peso molecular y se sigue detectando la de entorno a 10kDa, cuya intensidad de banda a penas se ve reducida, en este caso no se estudió el efecto de DIC, aunque viendo los resultados favorables que genera tanto en las albúminas 2S como en las leguminas 11S, sería interesante estudiar su efecto en las LTP.

4.3 Análisis electroforético e inmunodetección en muestras de anacardo

En la Figura 7 se muestran los resultados de la electroforesis en SDS-PAGE y sus correspondientes inmunodetecciones con IgG anti-2S, anti-11S y anti-LTP (Figuras 7.B, 7.C y 7.D, respectivamente). En el caso de anacardo los tratamientos analizados fueron los mismos que para pistacho (C60, AU1, AU2 y DIC7) y al igual que en pistacho no se analizó el efecto del tratamiento DIC para la inmunodetección con anticuerpos anti LTP.

La electroforesis de harinas de anacardo (Fig 7.A) genera una distribución proteica similar a la observada en pistacho: en la zona de 50kDa se observa una banda que podría corresponderse con la vicilina 7S Ana o 1. Las bandas localizadas alrededor de los 33 y 22kDa son compatibles con las posiciones de las subunidades (ácida y básica) de Ana o 2 (legumina 11S). Finalmente, la banda observada entorno a 10kDa podría coincidir con la posición del alérgeno Ana o 3 (14kDa). En estudios previos, Venkatachalam et al.⁷⁸ observaron que los alérgenos de anacardo presentaban una alta estabilidad frente a diversos tratamientos, como cocción, cocción a presión, microondas, tostado, y tratamientos no térmicos como la radiación γ o la variación de pH. En nuestros resultados, de forma similar a lo que ocurre en el caso de pistacho, se puede observar que el tratamiento mediante cocción 60min (C60) no afecta al patrón proteico, siendo este idéntico al del control. En autoclave también disminuye el número e intensidad de bandas a medida que las condiciones de presión y temperatura se endurecen, obteniéndose en el tratamiento AU2 una eliminación casi total de bandas proteicas a excepción de una de bajo peso molecular de entorno a 10kDa y compatible con la albúmina 2S Ana o 3, resultados similares son observados por Sanchiz et al.⁵⁰, en los que se concluye que el procesado con autoclave a 138°C, 30min es el más eficiente para disminuir las propiedades alergénicas en este fruto seco.

El tratamiento DIC7 también se ven cambios destacables con respecto al control, incluso más acusados que los generados con AU1, pero sin alcanzar la reducción obtenida con AU2.

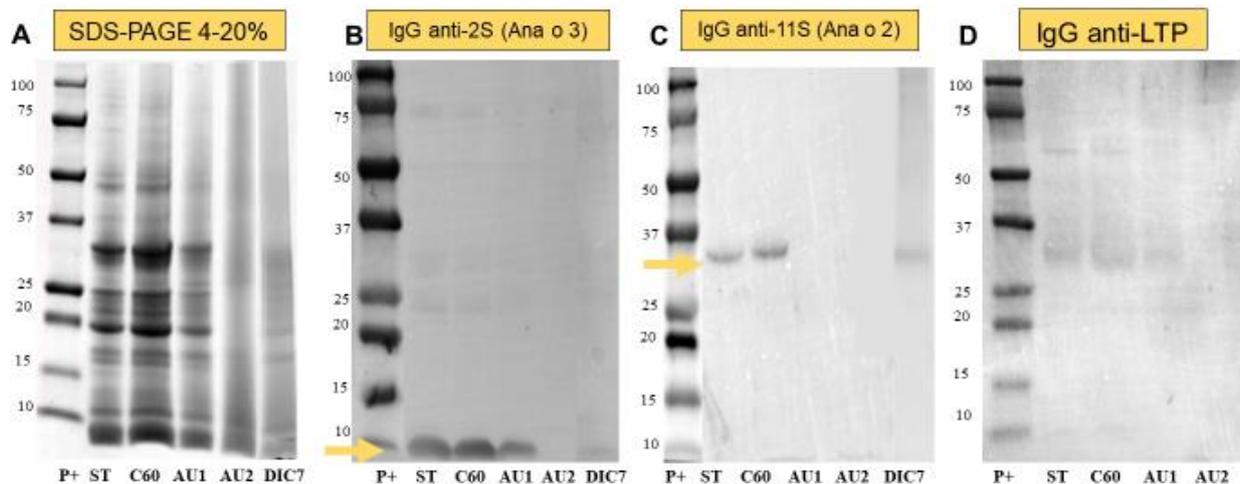


Figura 7: SDS-PAGE (4-20%) de pistacho (20µg proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan los posibles alérgenos detectados.

El estudio de inmunodetección con anticuerpos IgG en harinas de anacardo se muestra en las Figuras 7.B, 7.C y 7.D. En el caso de la inmunodetección anti-2S (Fig. 7.B) es detectada una única banda en torno a los 10kDa tanto en el control como en los tratamientos a excepción de AU2, en el que dicha banda compatible con Ana o 3 (14kDa) se elimina completamente, en el caso del tratamiento con AU1 la intensidad se ve ligeramente disminuida con respecto al control y al tratamiento C60, en el caso de DIC7 la banda es detectada, pero con una muy baja intensidad. En la inmunodetección con el anticuerpo anti-11S (Fig. 7.C) destaca la presencia de una proteína de peso molecular 30kDa, que podría corresponderse con la subunidad ácida de la legumina Ana o 2, esta banda se mantiene en el tratamiento más débil (C60) y en DIC7, aunque en este último caso con una intensidad reducida con respecto a control, en el caso de los autoclaves, ambos la eliminan completamente. Finalmente, en la Fig. 7.D se muestra el WB anti-LTP, en el caso de anacardo no se ha descrito ninguna proteína LTP como alérgica. En dicha figura no se detecta ninguna banda proteica, aunque existen algunas bandas muy tenues en torno a los 30 y 60kDa, que posiblemente sean debidas a interacciones no específicas.

4.4 Análisis electroforético, inmunodetección en muestras de avellana y selección enzimática

En avellana se obtuvo el perfil electroforético y los Western Blot para determinar el efecto del procesado en el perfil proteico de este fruto seco (Figura 8). En este caso se analizó el procesado mediante calor por cocción (C60), altas presiones hidrostáticas (300-600MPa) y dos tratamientos que combinan presión y temperatura: autoclave (AU1 y AU2) y DIC 7bar, 120s

(DIC7). Como en el caso anterior, en el análisis de inmunoreactividad se utilizaron los anticuerpos IgG anti-2S, anti-11S y anti-LTP.

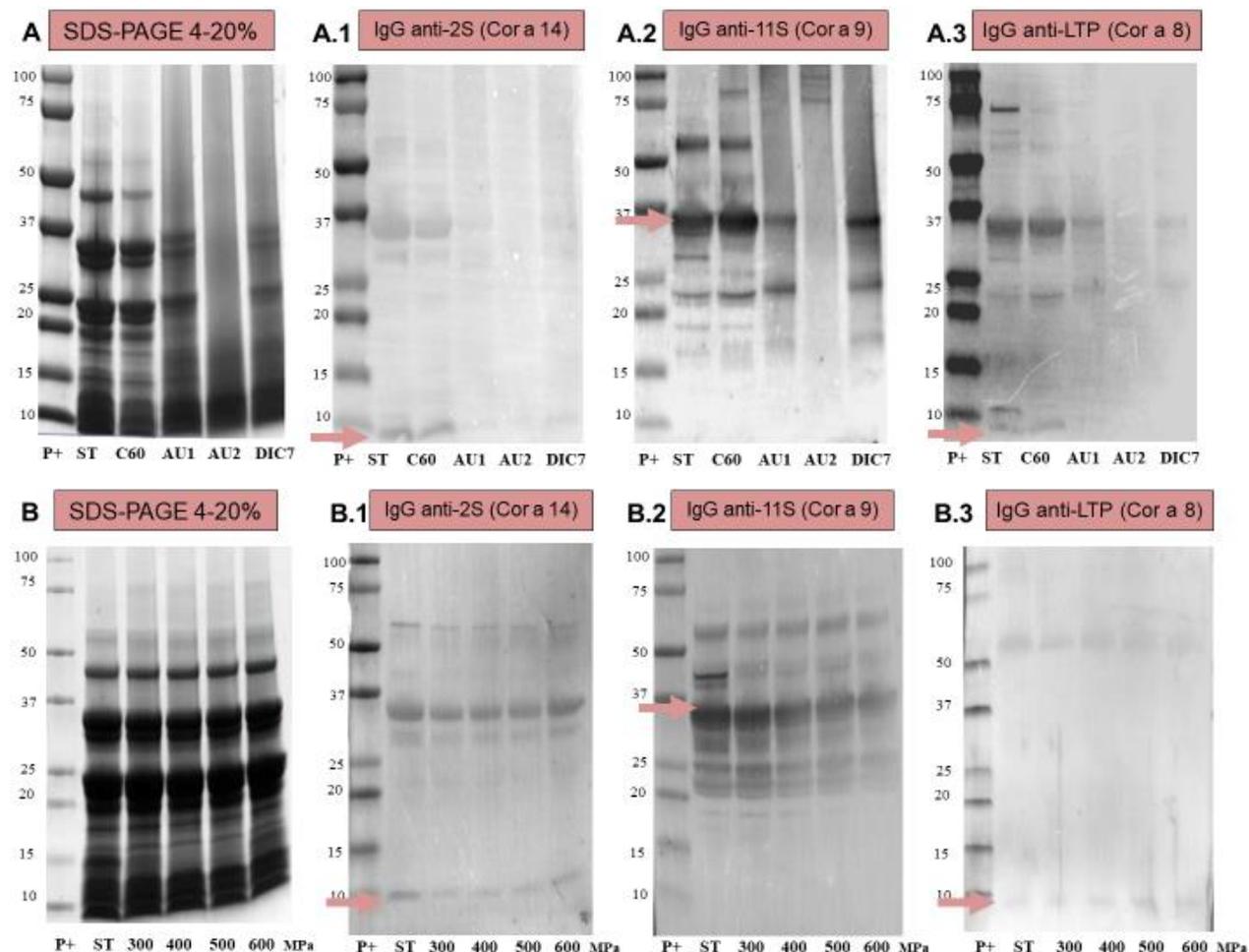


Figura 8: SDS-PAGE (4-20%) de avellana (20 μ g proteína/carril) control (ST) y tratada: cocción (C60), autoclave (AU1 y AU2) y DIC (DIC7) (A) y HHP (300-600MPa) (B), junto con sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (A.1 y B.1), anti-11S (A.2 y B.2) y anti-LTP (A.3 y B.3). Las flechas señalan la posición de posibles alérgenos.

En las Figuras 8.A y 8.B aparecen los geles SDS-PAGE de harinas de avellana control y tratadas con tratamiento térmico combinado o no con presión (Fig. 8.A) y únicamente con presión (Fig. 8.B). El perfil electroforético muestra un patrón de bandas que abarca desde pesos moleculares inferiores a 10kDa y hasta los 50-55kDa. Destaca la señal causada por bandas de bajo peso que incluirían las proteínas Cor a 1, 2, 8 y 12-15, que presentan pesos moleculares desde los 9 hasta los 17kDa. También son destacables las bandas localizadas en torno a los 37 y 50kDa, siendo compatibles con las cupinas Cor a 9 y Cor a 11 (40 y 48kDa).

El tratamiento térmico con cocción (C60) genera una ligera reducción en la intensidad de banda con respecto al control (ST), esta reducción de intensidad es más notoria en el caso del tratamiento más suave de autoclave (AU1), que además es capaz de eliminar alguna de las

bandas proteicas, resultados similares a los del AU1 son los del tratamiento DIC7, en los que se reduce incluso más la intensidad de banda con la ventaja de que el tiempo de tratamiento es mucho menor (30min en autoclave y 120s en DIC). El tratamiento más efectivo sería el de autoclave 138°C, 30min (AU2), en el que se eliminan la totalidad de las bandas a excepción de las de menor peso molecular (señal en 10-15kDa). Resultados similares fueron obtenidos por López et al., 2012⁴⁹, en los que se analizaron cuatro tratamientos con autoclave (121°C y 138°C durante 15 y 30min), obteniendo como resultado que en los tratamientos de autoclave a 138°C desaparecían las bandas inmunorreactivas en todos los sueros de pacientes alérgicos a avellana analizados. En ese mismo estudio también se analizó el efecto de las HHP con sueros de pacientes alérgicos, sin observarse reducción de la alergenicidad in vitro tras dicho tratamiento⁴⁹. Estudios posteriores de Prieto et al.⁶² analizaron el extracto de proteína y sobrenadante tras el tratamiento a altas presiones en avellana, confirmando que no era efectivo en la alteración de la inmunorreactividad, aunque si observaron cambios en la solubilidad de la proteína tras el tratamiento, reduciéndose significativamente la intensidad de bandas proteicas a medida que las condiciones se endurecían. En nuestro estudio, los resultados son similares y llevan a la deducción de que HHP no reduce la carga proteica en avellana, dado que el patrón obtenido es idéntico al del control incluso en el tratamiento más drástico (600MPa).

En las Figuras 8.A.1 y 8.B.1 aparece la inmunodetección con anticuerpo anti-2S, hasta la fecha sólo se ha descrito una proteína alergénica de tipo albúmina 2S en avellana, Cor a 14 de 10kDa aparece señalada con una flecha y es reconocida en avellana sin tratar (ST), cocción 60min (C60) y en todos los tratamientos de HHP (300-600MPa), por lo que se puede deducir que estos no son capaces de eliminar esta proteína, los tres tratamientos que combinan calor y presión (AU1, AU2 y DIC7) sí son eficientes en la eliminación de esta albúmina 2S. Es destacable la inmunodetección de una proteína de unos 37kDa tanto en los controles como en los tratamientos descritos anteriormente por no generar efecto en este tipo de proteínas. En el caso de las Figuras 8.A.2 y 8.B.2 se muestra el WB con anti-11S, en el que se detectan varias bandas proteicas, siendo la más marcada la localizada por debajo de 37kDa (señalada) que podría ser compatible con la legumina 11S Cor a 9 de 40 kDa. En el caso de las leguminas 11S sólo el tratamiento AU2 es capaz de eliminarlas, en el caso de AU1 y DIC7 también se eliminan algunas y se reduce la intensidad de las que resisten el tratamiento, respecto a los tratamientos de cocción y altas presiones, no generan ningún efecto, al igual que ocurría con las albúminas 2S. Finalmente la inmunodetección con IgG anti-LTP se muestra en las Figuras 8.A.3 y 8.B.3, la proteína Cor a 8 (nsLTP de avellana) es reconocida y aparece marcada con una flecha en torno a los 9kDa,

esta proteína sigue siendo detectable en C60 y en todos los tratamientos HHP, sin embargo, los dos tratamientos de autoclave y el tratamiento DIC7 son capaces de eliminarla, este último presenta además la ventaja de ser un tratamiento durante cortos periodos de tiempo, lo que evita los daños causados por calor.

Al igual que en cacahuete, en avellana también se realizó un estudio para determinar qué enzimas proteolíticas (E1-E7) eran más efectivas en la reducción proteica en este fruto seco, para ello se realizó una electroforesis en gel poliacrilamida y se analizó el efecto de dichas enzimas en el patrón proteico a distintos tiempos de tratamiento (desde 0h en el que la enzima no realiza efecto y por tanto sirve de control y, hasta 19h).

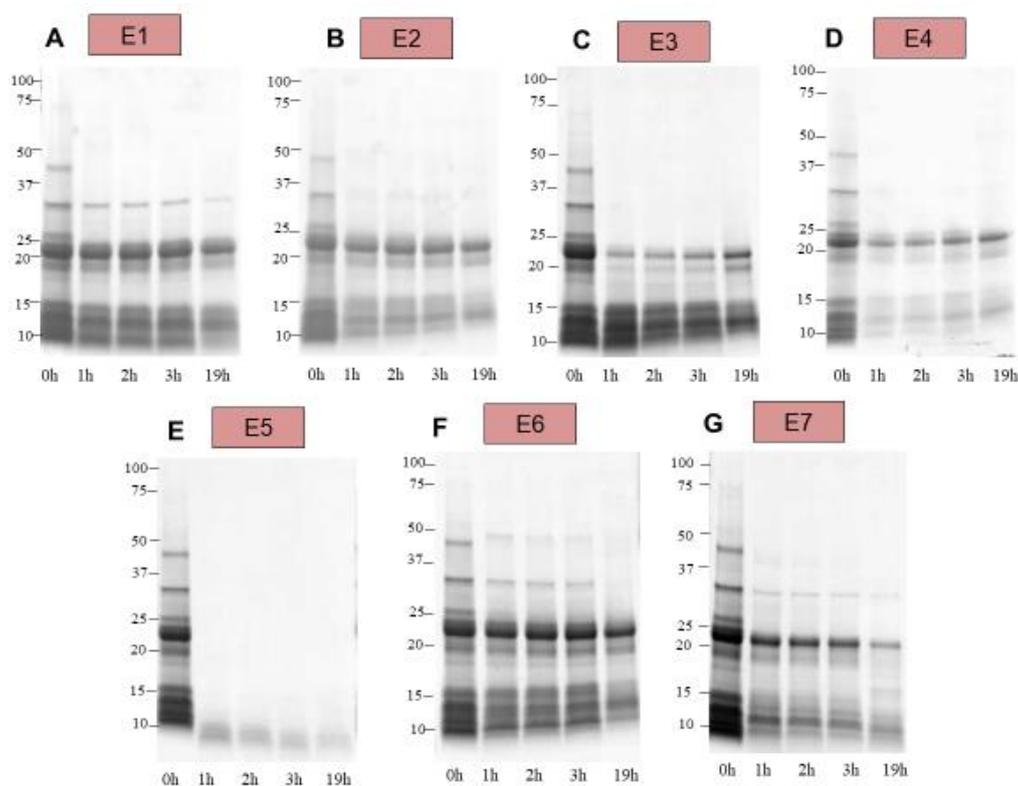


Figura 9: SDS-PAGE (4-20%) de avellana (20µg proteína/carril) de muestras control (0h) y tratadas con enzimas E1-E7 (A-G) a distintos tiempos (1-19h).

Los resultados del tratamiento enzimático en avellana se muestran en la Fig. 9. En este fruto seco la mayoría de las enzimas tienen un efecto similar en la distribución de bandas, a excepción de la enzima E5 (Fig. 9.E) que genera un efecto similar al que generaba en cacahuete, en el menor tiempo de tratamiento (1h) no sólo se eliminan casi la totalidad de las bandas, sino que además en las bandas no eliminadas (en torno a 10kDa) se reduce mucho la intensidad con respecto al control (0h). Por lo tanto, en el caso de avellana se seleccionará únicamente la enzima E5 (Protin SD- AY10) al ser la que genera cambios drásticos de reducción proteica

durante un tiempo de tratamiento de 1h puesto que no se aprecian cambios a tiempos más largos de tratamiento, al igual que ocurría para cacahuete.

4.5 Análisis electroforético e inmunodetección en muestras de almendra

En el caso de almendra se analizó el perfil electroforético y la inmunoreactividad frente a IgG anti-2S, anti-11S y anti-LTP, de muestras control (ST) y sometidas a diferentes tratamientos de procesado, que incluyen: procesado térmico (C60), procesado por presión mediante la aplicación de HHP (600MPa) y combinación de presión y temperatura con tratamiento en autoclave a distintas presiones y temperaturas (AU1 y AU2). Los resultados obtenidos de ambos análisis se muestran en la Figura 10.

En la Figura 10.A se muestra la electroforesis en gel de poliacrilamida de harinas de almendra control (ST) y tratadas. Las bandas proteicas con una mayor intensidad se localizan en torno a los 20 y 40 kDa y las menos intensas abarcan un alto número de pesos moleculares distribuidos por todo el gel. Otros autores⁷⁹, han analizado el efecto del tratamiento térmico húmedo y seco en proteínas de almendra, observando que el tratamiento en un medio líquido favorecía más la reducción de alergenicidad, aunque solo observaron ligeros cambios a tiempos largos de tratamiento (cocción 100min), en nuestro caso la cocción durante 60min genera un ligero efecto en la intensidad de las bandas. El tratamiento con autoclave sí genera diferencias significativas con respecto al control, tanto en el tratamiento más suave a 121°C, 30min (AU1) en el que se reduce el número de bandas, aunque se siguen observando las bandas descritas anteriormente como de mayor intensidad (20 y 40kDa). La mayor reducción tanto en número como en la intensidad de bandas se produce en el tratamiento AU2, en el que se eliminan casi la totalidad de las bandas a excepción de una banda de bajo peso molecular (aproximadamente 10kDa). En el caso de las altas presiones, ni si quiera el tratamiento más drástico (600MPa) causa efecto en el patrón proteico siendo este casi idéntico al de la harina de almendra sin tratar. Resultados similares fueron obtenidos por Li et al.⁸⁰, que analizó varios tratamientos con HHP y ni si quiera el más drástico (600MPa, 30min) tuvo efecto sobre los alérgenos de almendra.

En la Fig.10.B aparece el WB con anticuerpos IgG anti- 2S, en almendra sólo se ha descrito una albúmina 2S (Pru du 2S de 12kDa) compatible con la banda detectada de menor peso molecular (señalada), destacan, además, un par de bandas en torno a los 30kDa, no correspondientes con ninguna albúmina descrita en este fruto seco. Los resultados de la incubación con el anticuerpo IgG anti-11S se muestran en la Fig.10.C, en almendra existe una

legumina 11S hexamérica de 360kDa, formada por polipéptidos de dos cadenas: una α de mayor peso molecular (40kDa) y otra β de menor peso (20kDa), señaladas ambas en la inmunodetección anti-11S. Aparecen, además, distintas bandas poco definidas entre los 20 y 40kDa, pudiendo ser complejos de degradación o agregación proteica. Finalmente, en el caso de las LTP (Fig. 10.D) se detectan algunas bandas que podrían ser inespecíficas. Respecto al efecto del tratamiento es similar en los tres WB: la cocción y las HHP no generan ningún efecto en comparación con el control (ST) y los tratamientos con autoclave son eficaces en la reducción de bandas proteicas, siendo más eficaz el tratamiento más drástico de presión y temperatura (AU2).

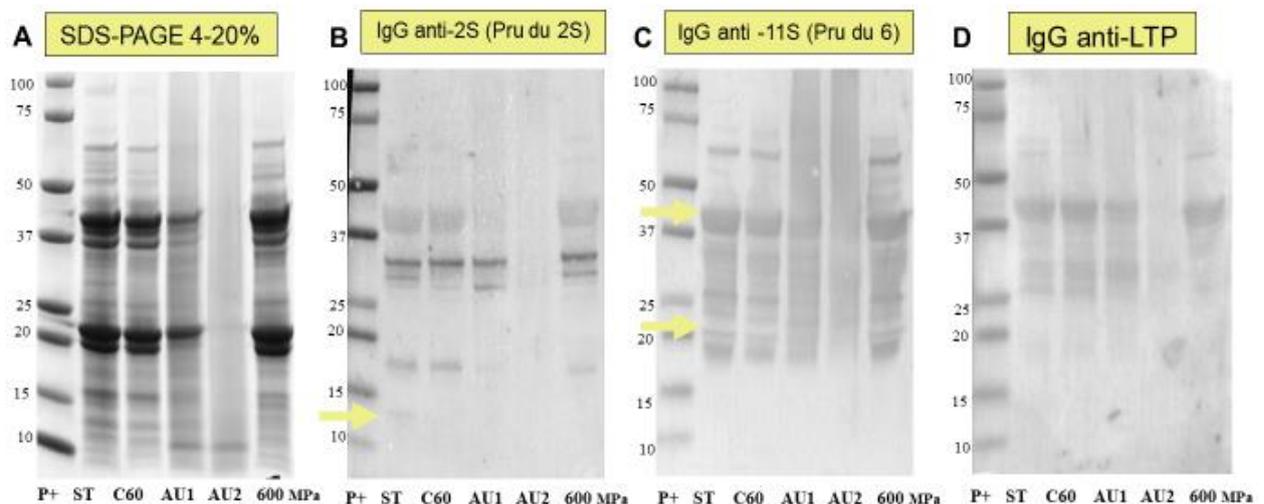


Figura 10: SDS-PAGE (4-20%) de almendra (20 μ g proteína/carril) (A) y sus respectivos Western Blot con IgG anti-2S (B), anti-11S (C) y anti-LTP (D). Las flechas señalan la posición de posibles alérgenos.

4.6 Inmunodetección en harinas de pistacho y anacardo DIC con IgE

El tratamiento DIC a 7bar, 120s (DIC7) ha demostrado ser más eficaz que el tratamiento de autoclave a 121°C, 30min (AU1) en la mayoría de los análisis electroforéticos e inmunodetecciones con anticuerpos específicos frente a proteínas alergénicas vegetales, además en algunos casos genera reducciones similares e incluso superiores a las obtenidas en el procesado con autoclave AU2 (138°C, 30min). Este tratamiento presenta diversas ventajas frente a otros tratamientos como son: tiempos de tratamiento muy cortos (120s en DIC frente a los 30min necesarios en autoclave), presiones superiores (hasta 8bar mientras que en autoclave se alcanzan 3bar como máximo) y una bajada instantánea de la presión tras el tratamiento lo que detiene la degradación térmica y evita el daño por calor. Debido a la interesante acción que genera el tratamiento DIC en la reducción de proteínas alergénicas en harinas de fruto seco, se plantea como tratamiento con un gran potencial para este fin. Es por ello que se realiza un

estudio más profundo de este tratamiento, empleando para ello harinas de pistacho y anacardo y realizando un análisis de inmunodetección con sueros individuales de 11 pacientes sensibilizados a ambos frutos secos.

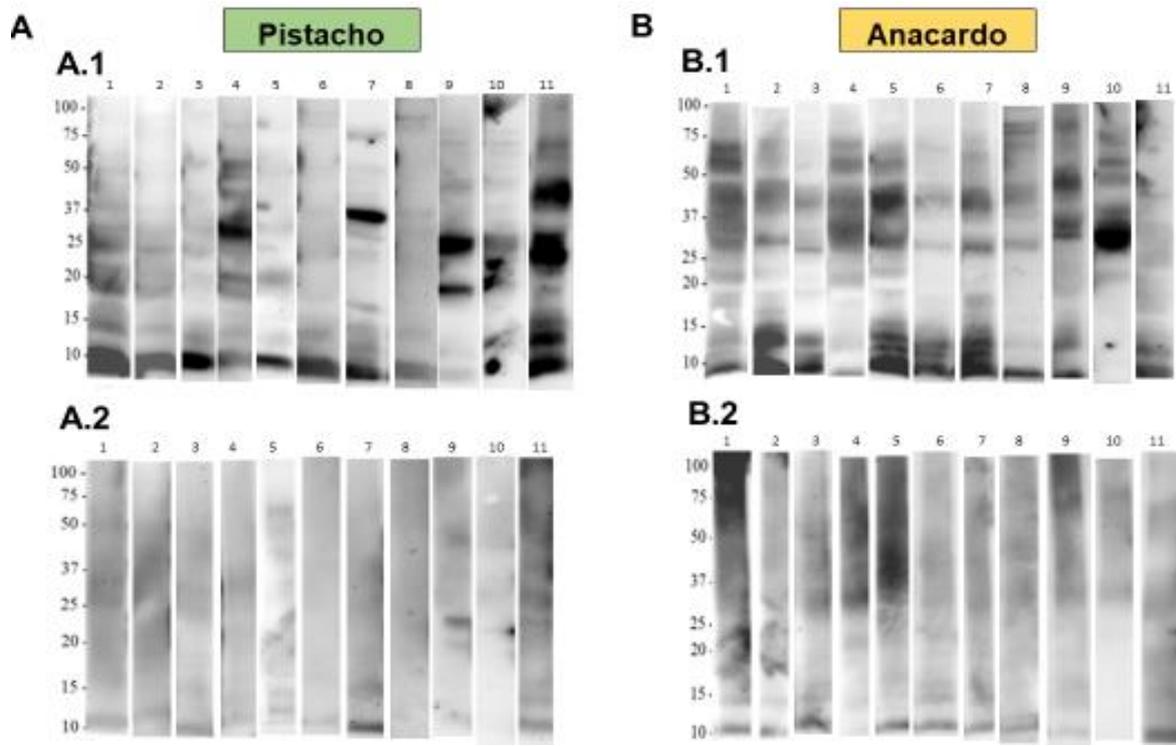


Figura 11: Western Blot con IgE de sueros de pacientes humanos sensibilizados a pistacho y anacardo (1-11) de harinas de pistacho (A) y anacardo (B) (20µg de proteína/carril), de muestras control (A.1 y B.1) y tratadas con DIC 7bar, 120s (DIC7) (A.2 y B.2).

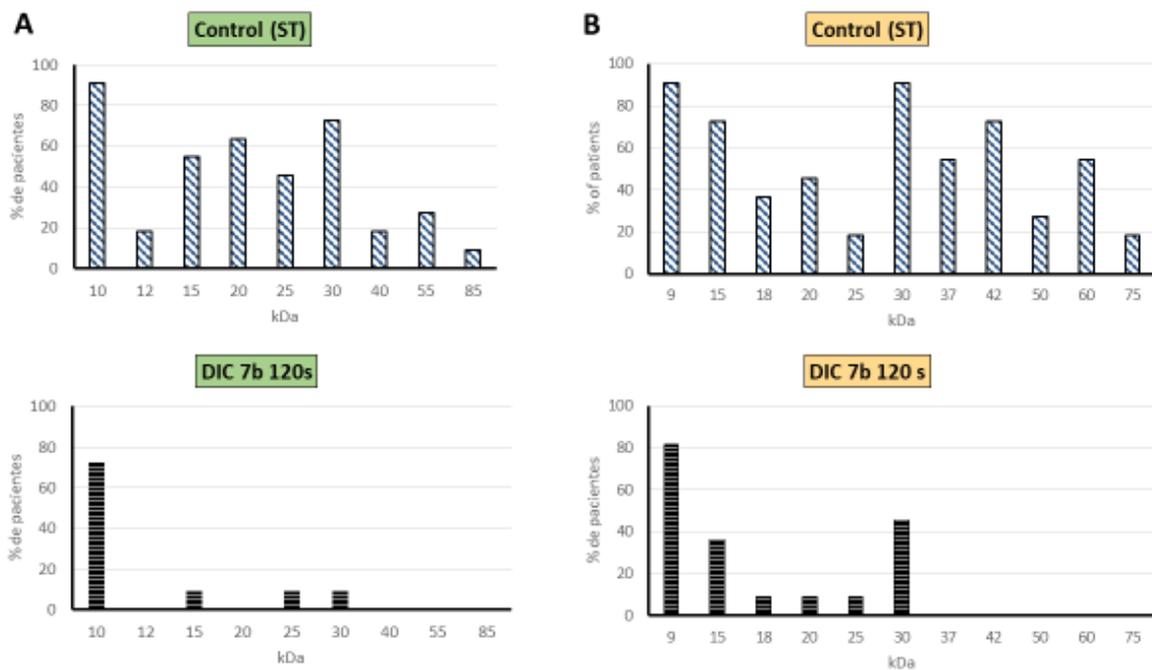


Figura 12: Porcentaje de pacientes que reaccionan con cada banda proteica de pistacho (A) y anacardo (B) sin tratar (ST) y tratados con DIC 7 bar 120 s. Análisis realizado con el software Quantity One (BioRad).

Otros autores⁵⁰, han llevado a cabo inmunodetección con harinas de pistacho y anacardo utilizando una mezcla de sueros en vez de sueros individuales, lo que genera la obtención de menor variabilidad en los resultados. Los sueros de los pacientes utilizados en el presente estudio pertenecen a niños con sensibilidad tanto a pistacho como a anacardo, algunos con historial clínico bien caracterizado, con reacciones que van desde agudas como el edema o la urticaria hasta reacciones adversas más graves (anafilaxia), otros presentan sensibilización, pero sin haber llegado a consumirlos. Los resultados de la inmunodetección con harinas de pistacho se muestran en la Fig. 11.A y los de anacardo en la Fig. 11.B.

En la Fig. 11.A.1 se muestra el WB con sueros humanos en harinas de pistacho control, en el primer carril se muestran los resultados para el paciente 1, que detecta bandas en torno a los 10, 20 y 30kDa, siendo estas compatibles con Pis v 1 y con las subunidades ácida y básica de Pis v2/5. Otros pacientes presentan un patrón similar al detectado en el paciente 1, estos son: 2-5, 7, 9 y 11, en la mayoría de estos la inmunodetección en la zona de las albúminas (zona de 10kDa) es más intensa que la de las leguminas, a excepción del paciente 9 en el que ocurre lo contrario y las leguminas son detectadas más intensamente. Cabe destacar que la detección de una banda alrededor de 40kDa en el paciente 7, podría deberse a una interacción no específica. En el caso del paciente 6, destaca la interacción con una proteína de aproximadamente 10kDa, posiblemente Pis v 1, este reconocimiento de una única banda en la zona de pesos moleculares de las albúminas 2S se produce también en el paciente 8. Respecto al paciente 10 se diferencia respecto a los anteriores en que no presenta inmunoreactividad a las albúminas 2S, sino que únicamente reconoce las subunidades ácida y básica de las leguminas 11S (detección de bandas de 20 y 30kDa aproximadamente). Se observan diferencias individuales en el patrón reconocido por cada uno de los pacientes. Todos a excepción del paciente 10 reconocen la albúmina 2S y todos a excepción de los pacientes 6 y 8, las leguminas 11S. El efecto del tratamiento DIC7 se muestra en la Fig. 11.A.2, se puede observar cómo se disminuye notablemente la inmunodetección de la albúmina Pis v 1 (10kDa), reduciéndose la intensidad de banda, aunque esta sigue estando presente en todos los pacientes a excepción del 8 y el 10 que no la detectaba. Respecto a las leguminas, DIC7 es capaz de reducirlas llegando incluso a eliminarlas, en los pacientes 1-4, 6 y 7 dejan de detectarse bandas de pesos moleculares coincidentes con las subunidades de las leguminas. Estos datos se resumen en la Fig. 12.A, en la que se observa la cantidad de bandas detectadas por los 11 sueros antes y después del tratamiento (control y tratamiento DIC7), estos datos se calcularon con el Software Quantity One y como resultado se obtuvo un porcentaje de reducción de la inmunoreactividad en pistacho del 75%.

En la Fig. 11.B.1. se puede ver el WB con sueros humanos (1-11) en harinas de anacardo control. El paciente 1 reconoce bandas de en torno a 10, 20, 30 y 50kDa compatibles con las proteínas 2S y 11S, Ana o 3 y Ana o 2 intacta y sus respectivas subunidades ácida y básica, aunque, también cabe destacar que la banda de 50kDa podría corresponderse con Ana o 1. Un patrón similar se observa en los pacientes 4 y 5. Respecto al paciente 2 reconoce bandas de aproximadamente 10kDa (posiblemente la albúmina 2S, Ana o 3) y 30kDa (subunidad ácida de Ana o 2). Los pacientes 3, 6, 7 y 11 presentan un inmunoreactividad similar a la del paciente 2. Respecto a los pacientes 8-10, presentan un patrón de bandas diferente a los anteriores, en el caso de los pacientes 8 y 9 reconocen una banda de unos 10kDa compatible con Ana o 3, bandas de en torno a 25 y 37ka que podrían corresponderse con las subunidades (α y β) de Ana o 2 y una proteína de unos 75kDa, que no se corresponde con ninguno de los alérgenos descritos en anacardo. Respecto al paciente 10 y al igual que le ocurría en la inmunodetección de harinas de pistacho no reconoce la albúmina 2S, si reconoce las bandas de en torno a 20, 30 y 50kDa correspondientes con las leguminas 11S (subunidades e intacta respectivamente), además se observa una ligera inmunodetección en torno a los 75kDa como ocurría en los pacientes 8 y 9. Es destacable que en la mayoría de los sueros se produce una fuerte detección de banda en torno a 37-50kDa, pero esta no es compatible con ninguna proteína alérgica descrita para anacardo, por tanto, se desconoce. Al igual que ocurría en pistacho, hay variabilidad individual en el patrón de bandas reconocidas por los sueros individuales. Todos ellos reconocen la albúmina 2S (Ana o 3) a excepción del paciente 10 y las leguminas 11S, tanto las subunidades como la proteína intacta en alguno de los casos (pacientes 1, 4, 5 y 11), aunque esta banda localizada en torno a los 50kDa también podría corresponderse con la vicilina Ana o 1. Respecto al efecto del tratamiento DIC7 se muestra en la Fig. 11.B.2, es destacable la degradación proteica en la zona de alto peso molecular, en la zona de bajo peso molecular la intensidad de la banda compatible con la albúmina 2S (Ana o 3) tiende a disminuir con el tratamiento pero sin llegar a eliminarse en la mayoría de los casos. Al igual que en pistacho, en anacardo también se cuantificó la reducción de número de bandas detectadas por cada paciente mediante Quantity One. En este caso los resultados se muestran en la Fig. 12.B, el porcentaje de reducción de detección de bandas con sueros en harinas de anacardo tras el tratamiento DIC7 y con respecto al control fue del 67,2%.

Patrones similares a los obtenidos en este estudio han sido observados por Blanco et al.⁸¹ en cuyo estudio se emplearon también sueros de pacientes españoles sensibilizados frente a pistacho y anacardo, en el caso de pistacho se detectaron proteínas de 13-33kDa y en el caso de

anacardo de en torno a 19-50kDa. En estudios previos de Cuadrado et al.⁶⁴ en los que se evaluaba la reactividad frente a IgE en harinas de pistacho y anacardo utilizando sueros individuales de origen norteamericano y, al igual que se aprecia en el presente estudio, observaron diferencias individuales en cada uno de los patrones inmunológicos. En este caso la inmunodetección de bandas se centraba en zonas de peso molecular que oscilaban de 20 a 100kDa, mientras que en nuestros resultados las proteínas detectadas no superan los 60kDa. Esta destacable diferencia a nivel de inmunoreactividad y de patrón de bandas reactivas en los distintos pacientes puede ser debido a que la evaluación de la capacidad inmunorreactiva empleando sueros humanos puede dar lugar a resultados diferentes, no solo entre individuos de una misma población sino también entre las poblaciones en función de su origen geográfico⁶.

Aunque existen diferencias interindividuales, algunos de los pacientes presentan patrones similares de reactividad. Casi todos los pacientes reconocen las albúminas 2S de pistacho y anacardo y un alto número de ellos las leguminas 11S. Esta inmunodetección similar a las proteínas alergénicas de ambos frutos secos puede deberse a la estrecha relación botánica que presentan, ambos pertenecen a la familia *Anacardiaceae* y generan reactividad cruzada⁸². Se ha demostrado que la identidad de secuencia de las albúminas 2S: Pis v 1 y Ana o 3 es del 64% y; que la de las leguminas 11S: Pis v 2 y Ana o 2 es del 48%²⁶, por lo que es esperable que individuos alérgicos a dichas proteínas en pistacho lo sean también frente a las de pistacho.

Todos los sueros a excepción del paciente 10 reconocen las albúminas 2S Pis v 1 y Ana o 3. Varios estudios han descrito la alta reactividad que presentan estas proteínas en estos frutos secos: Pis v 1 (alérgeno mayor) es reconocida por más del 50% de los sueros de pacientes alérgicos a pistacho⁸³; Ana o 3 es detectada por el 93% de niños alérgicos a anacardo, es tan inmunoreactiva que se emplea como indicador clínico de alergia a este fruto seco, siendo más específica que el extracto completo de anacardo⁸⁴. Este tipo de proteínas presentan una estructura compacta y estable que les confiere una alta resistencia a la proteólisis⁷. Esta resistencia puede observarse en el tratamiento DIC, pues, aunque su reconocimiento se disminuye en todos los pacientes las bandas no llegan a desaparecer. Esto ya era observable en los WB con IgG anti-2S (Figuras 6.B y 7.B) en los que las bandas compatibles con Pis v 1 y Ana o 3 únicamente se eliminaban tras el tratamiento con autoclave a 138°, 30min.

Las leguminas 11S son detectadas en casi todos los pacientes, la intensidad de banda es bastante menor con respecto a la de las albúminas 2S, a excepción de los pacientes 4, 9 y 10 (que únicamente reacciona frente a este tipo de proteína). Respecto al efecto del tratamiento DIC7

sobre este grupo de proteínas, se puede deducir que son menos resistentes que las albúminas 2S, pues su detección desaparece en la mayoría de los pacientes. Estudios previos han descrito que las leguminas 11S se despliegan a 94°C, por lo que el tratamiento DIC sería capaz de alterarlas, reduciendo la capacidad de unión de anticuerpos^{44,77}. Estos datos ya eran observables en los WB de pistacho y anacardo con IgG anti-11S (Figuras 6.C y 7.C), en las que en el caso de anacardo las leguminas 11S dejaban de detectarse en el tratamiento con autoclave más débil (AU1) y, en el caso de pistacho el tratamiento DIC reducía su inmunoreactividad.

4.7 Electroforesis e inmunodetección IgE de pistacho y anacardo: condición nativa y reductora

Con la finalidad de profundizar más en el efecto del tratamiento DIC en la capacidad alergénica de pistacho y anacardo, se llevó a cabo una electroforesis con las harinas de ambos frutos secos, control y tratados en condiciones nativas (sin β -mercaptoetanol: -BM) y en condiciones reductoras (con BM: +BM), con la finalidad de analizar los posibles cambios generados en el patrón proteico. Continuando con dicho objetivo, también se llevó a cabo su respectiva inmunodetección, empleando para ello el suero individual del paciente 9 (cuyo valor IgE oscila entre 30kU/l en pistacho y 20kU/l en anacardo).

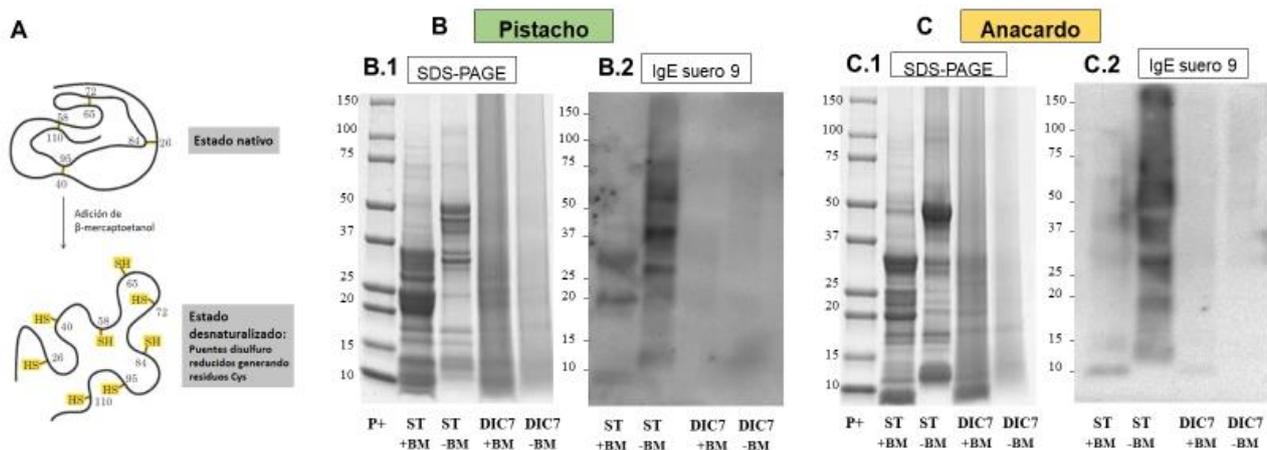


Figura 13: Esquema de la desnaturalización de proteínas causada por β -mercaptoetanol⁸⁷ (A)⁶⁶. SDS-PAGE (4-20%) de pistacho y anacardo (20 μ g proteína/carril) (B.1 y C.1, respectivamente) y sus correspondientes Western Blot con IgE de suero humano (paciente 9) (B.2 y C.2) de muestras control (ST) y tratadas con DIC 7bar, 120s (DIC7), en condiciones nativas (-BM) y desnaturalizantes (+BM).

En condiciones nativas, las proteínas mantienen sus cadenas polipeptídicas unidas y su estructura tridimensional, separándose en la electroforesis por tamaño y forma⁸⁵. En el caso de la electroforesis en condiciones desnaturalizantes, descrita por Laemmli⁸⁶, las proteínas se separan en función de su tamaño⁸⁵. En esta, se incluyen agentes desnaturalizantes: reductores como el β -mercaptoetanol, detergentes o coáctropos que rompen las interacciones hidrofóbicas

desnaturalizando las proteínas (adoptan una estructura lineal). En el caso del β -mercaptoetanol, los puentes disulfuro (Cys-S-S-Cys) se reducen a grupos tioles (Cys-SH)⁸⁷, además para asegurar la desnaturalización se calienta la muestra antes de cargarse en el gel (Fig. 13.A.)^{86,88}.

Tanto las bandas de la electroforesis de pistacho como las de anacardo (Fig. 13.B.1 y 13.C.1) presentan un patrón similar entre condiciones desnaturalizantes (+BM) y nativas (-BM), la principal diferencia se debe a que las bandas proteicas en condiciones nativas se desplazan hacia pesos moleculares superiores, pues en estas condiciones las cadenas polipeptídicas continúan unidas y las proteínas presentan un mayor tamaño y peso. En pistacho la albúmina Pis v 1 y la legumina 11S Pis v2 presentan pesos moleculares más elevados en condiciones nativas (17 y 50kDa, respectivamente) que las subunidades detectadas en condiciones reductoras (7 y 32kDa)²⁶. De la misma forma ocurre en anacardo, por ejemplo, la vicilina Ana o 1 presenta un peso de 50kDa, mientras que su precursor nativo es de 65kDa³¹. Respecto al efecto del tratamiento DIC, es muy parecido en ambas condiciones, se reduce el número e intensidad de bandas hasta casi eliminarse completamente, cabe destacar que dicha reducción es más marcada en el caso de condiciones nativas (-BM) y que los alérgenos de anacardo son más resistentes al tratamiento que los de pistacho, cuyas bandas se eliminan en DIC7, mientras que en anacardo disminuyen en intensidad, pero siguen estando presentes. En el caso de la inmunodetección con IgE del paciente 9 (Fig. 13.B.2 y 13.C.2), se observa el mismo desplazamiento a pesos moleculares superiores en condiciones nativas detectándose un mayor número de bandas, con respecto a condiciones nativas. Esto podría deberse a que el cambio de conformación causado por el β -mercaptoetanol interfiere con la capacidad de unión de anticuerpos. El tratamiento DIC7 al igual que lo observado en la electroforesis, reduce la inmunodetección de banda hasta casi abolirla, demostrando ser un tratamiento eficaz en la reducción de alergenicidad.

4.8 Identificación de proteínas de pistacho y anacardo DIC mediante LC/MS/MS

Continuando con el estudio de harinas de pistacho y anacardo tratadas con DIC a 7bar 120s, se consideró interesante realizar un estudio de espectrometría de masas, con la finalidad de corroborar la correspondencia hecha sobre las bandas proteicas identificadas y, así descartar que las bandas reconocidas como posibles alérgenos en los geles electroforéticos, sean fragmentos u otras proteínas diferentes a las identificadas. La estrategia más empleada para el estudio de proteínas alergénicas mediante esta técnica implica un paso de separación de

proteínas mediante electroforesis y/o cromatografía líquida (LC), seguido de un análisis de espectrometría de masas (MS), obteniendo datos de las proteínas y péptidos identificados⁸⁹.

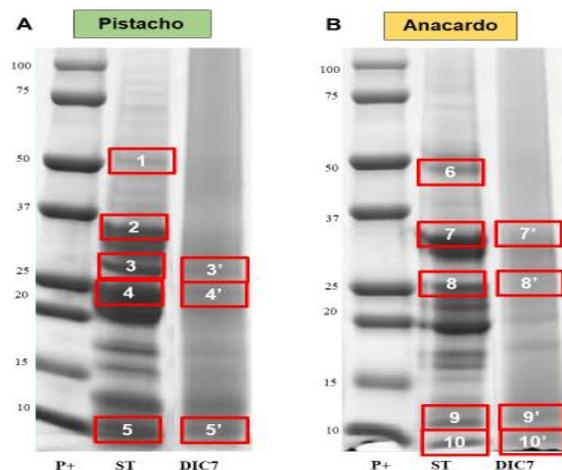


Figura 14: SDS-PAGE (4-20%) de pistacho (A) y anacardo (B) (20µg proteína/carril). Las bandas proteicas seleccionadas para el análisis con LC/MS/MS aparecen enmarcadas en rojo.

Para la realización de dicho estudio, se cargó un gel SDS-PAGE al 4-20% con harinas de pistacho y anacardo control (ST) y tratadas con DIC7, a continuación, ocho bandas de pistacho y nueve de anacardo fueron seleccionadas y cortadas manualmente para la identificación con LC/MS/MS. Estas bandas fueron digeridas con tripsina para llevar a cabo el análisis con espectrometría de masas. Las bandas seleccionadas se muestran en la Figura 14.

La caracterización de una proteína se puede obtener comparando los datos experimentales con los valores de masa de una base de datos de secuencia (en nuestro caso MASCOT). Gracias a que la digestión de una proteína con una enzima específica de escisión conocida, en nuestro caso tripsina, genera péptidos que representan la huella péptida y permiten la identificación inequívoca de la proteína⁸⁹⁻⁹¹.

En la Tabla 7 se resumen los datos de identificación de las proteínas de pistacho y anacardo seleccionadas. En pistacho se determinaron las 5 bandas seleccionadas en harina control y las 3 de tratamiento con DIC: Las banda 1 (50kDa) se identificó con las leguminas 11S Pis v2 y Pis v5, estas también se identificaron en la banda 2, junto con la vicilina 7S Pis v 3. Las bandas 3 y 3' coinciden con las dos isoformas de Pis v 2, al igual que las de 4 y 4'. La albúmina 2S Pis v 1 se detectó en la banda 5 y 5'. Respecto a anacardo, también se identificaron las 9 bandas seleccionadas para el análisis por LC/MS/MS: la banda 6 contenía péptidos de Ana o 1 y Ana o 2. Ana o 2 se encontró también en las bandas 7, 8, 7' y 8'. En las bandas 9 y 9' se identificaron las Ana o 3 y Ana o 2, respectivamente y, las bandas 10 y 10' (en torno a 10kDa) coinciden con la albúmina 2S Ana o 3. Estos resultados de LC/MS/MS confirman que las posiciones asignadas en las Figuras 6 y 7 para los alérgenos descritos de pistacho y anacardo.

Los resultados obtenidos muestran que las proteínas se degradan con el tratamiento DIC, tras el cual, se identifican un menor número de péptidos resistentes, aunque algunos fragmentos de alérgenos resisten y siguen identificándose, siendo destacable que dicha reducción es más marcada en pistacho que en anacardo, lo que indica que los alérgenos de este último son más

resistentes. Datos similares a estos fueron obtenidos por Cuadrado et al.⁶⁴ y Mattison et al.⁹² en los que la intensidad de banda y los péptidos alergénicos detectados mediante LC/MS/MS disminuían tras el tratamiento térmico combinado con proteólisis y tras el tratamiento con autoclave en pistacho y anacardo⁶⁴ y tras el tratamiento con calor en anacardo⁹².

Tabla 7: Proteínas de pistacho y anacardo identificadas por LC/MS/MS en muestras control y tratadas con DIC7

N.º de banda	Proteína identificada	Masa (kDa)	Puntuación MASCOT*	Péptidos emparejados
1	Pis v 2.01/Pis v 5 (11S)	54,465	309	35
2	Pis v 2.01/Pis v 5 (11S)	54,465	157	29
2	Pis v 3.01 (7S)	60,306	94	15
3	Pis v 2.01/Pis v 2.02 (11S)	55,133	140	20
4	Pis v 2.01/Pis v 2.02 (11S)	55,133	159	17
5	Pis v 1 (2S)	17,792	81	9
3'	Pis v 2.01/Pis v 2.02 (11S)	55,133	103	14
4'	Pis v 2.01/Pis v 5 (11S)	54,465	142	22
5'	Pis v 1 (2S)	17,792	66	6
5'	Pis v 5 (11S)	53,896	37	8
6	Ana o 1.01 (7S)	62,284	130	13
6	Ana o 2.01 (11S)	52,420	130	11
7	Ana o 2.01 (11S)	52,420	79	11
8	Ana o 2.01 (11S)	52,420	27	6
9	Ana o 3 (2S)	16,781	28	4
10	Ana o 3 (2S)	16,781	27	4
7'	Ana o 2.01 (11S)	52,420	140	18
8'	Ana o 2.01 (11S)	52,420	150	19
9'	Ana o 2.01 (11S)	52,420	62	10
10'	Ana o 3 (2S)	16,335	55	7

* Serán significativos aquellos valores mayores de 23 ($p < 0,05$). El valor MASCOT se calcula como $-10 \cdot \log_{10}(P)$, donde P es la probabilidad de que el emparejamiento sea por azar

Los resultados de este estudio podrían ser relevantes para el tratamiento de la alergia alimentaria, ya que el uso de péptidos con propiedades hipoalergénicas se ha propuesto como estrategia para desarrollar inmunoterapia frente a alergias alimentarias^{93,94}. Sin embargo, aunque los tratamientos con autoclave a 138°C 30min, DIC a 7bar 120s y tratamiento enzimático con E3 y E5, disminuyan la detección de bandas proteicas y de alérgenos, no implica que se reduzca la alergenicidad in vivo. Para comprobarlo, una buena aproximación sería el análisis en modelos de alergia in vitro como son los modelos celulares de basófilos humanos (BAT: Basophil Activation Test) o líneas celulares de basófilos humanizados (RBL: Rat Basophil Leukemia), modelos animales o ensayos clínicos mediante pruebas cutáneas (SPT: Skin Prick Test)^{6,95,96}.

4. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este Trabajo Fin de Máster se extrae las siguientes conclusiones:

- El análisis del perfil electroforético y de la inmunodetección con anticuerpos IgG anti-2S, anti-11S y anti-LTP, muestran que el tratamiento con calor mediante cocción 60 minutos no es efectivo para la reducción de alergenicidad, en ninguno de los frutos secos estudiados.
- Con el tratamiento a altas presiones hidrostáticas (HHP 100-600MPa), tras el análisis electroforético y las inmunodetecciones anti-2S, anti-11S y anti-LTP en harinas de avellana y almendra, no se observan diferencias entre las muestras tratadas y muestras control (sin tratar).
- El procesado térmico y de presión aplicado con un autoclave provoca una disminución drástica del reconocimiento de proteínas alergénicas, esta disminución es mayor a medida que aumenta la presión y tiempo de tratamiento. La reactividad de los alérgenos Ara h 3, Ara h 9, Pis v 1, Pis v 2, Pis v 5, Ana o 2, Ana o 3, Cor a 8, Cor a 9, Cor a 14, Pru du 6 y Pru du 2S se reduce considerablemente, llegando a eliminarse en algunos casos tras el tratamiento a 138°C, 30min.
- El tratamiento DIC a 7bar, 120s aplicado a cacahuete, pistacho, anacardo y avellana, ha demostrado ser más eficaz que la mayoría de los tratamientos en la reducción de número e intensidad de las bandas proteicas, tanto en el análisis electroforético como en el de inmunoreactividad frente a IgG, aunque sin alcanzar el efecto causado por el tratamiento más drástico de autoclave (138°, 30 min). Sin embargo, presenta ventajas frente a este, como son los tiempos más cortos de tratamiento lo que reduciría el deterioro causado por calor.
- Se ha demostrado que la hidrólisis de cacahuete con proteasas E3 (Protin SD-NY10) y E5 (Protin SD- AY10) durante 1h y de avellana con E5 reduce considerablemente el número de bandas proteicas. Estos tratamientos constituyen una valiosa herramienta potencial para la obtención de alimentos hipoalergénicos.
- La inmunodetección de harinas de pistacho y anacardo con IgE de sueros humanos, muestra una clara variabilidad individual en el patrón proteico. Tras el tratamiento con DIC a 7bar, 120s se logra una mayor reducción en pistacho (75%) que en anacardo (67,2%), lo que revela una mayor resistencia de este último frente a la degradación proteolítica.
- La identificación mediante espectrometría de masas (LC/MS/MS) corrobora que la asignación a partir de inmunodetección con IgG en harinas de pistacho y anacardo control y DIC a 7bar, 120s es correcta. Tras aplicación de dicho tratamiento se siguen detectando los péptidos resistentes: Pis v1, Pis v2 y Pis v5 en pistacho y Ana o 2 y Ana o 3 en anacardo.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. de La Cruz, S. ;, González, I. ;, García, T. ; & Martín, R. Artículo de Revisión Alergias alimentarias: Importancia del control de alérgenos en alimentos Food allergies: The importance of food allergen management. *Nutr. clín. diet. hosp* **38**, 142–148 (2018).
2. Johansson, S. G. O. *et al.* Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **113**, 832–836 (2004).
3. Muraro, A. *et al.* EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: Diagnosis and management of food allergy. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* **69**, 1008–1025 (2014).
4. Lehrer, S. B., Horner, W. E., Reese, G. & Taylor, S. Why are some proteins allergenic? Implications for biotechnology. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **36**, 553–564 (1996).
5. Chizoba Ekezie, F. G., Cheng, J. H. & Sun, D. W. Effects of nonthermal food processing technologies on food allergens: A review of recent research advances. *Trends in Food Science and Technology* vol. 74 12–25 (2018).
6. Madsen, C. Food Allergy Basic facts and how to live with it. *EuroPrevall* 1–25 http://www.eaaci.org/food-allergy/April 2012 Food Allergy_Basic facts and how to live with it.pdf (2009).
7. Fernández-Rivas, M. Alérgenos alimentarios. *Revista Española de Pediatría* **62**, 18–27 (2006).
8. Cuadrado, C., Sanchiz, A., Vicente, F., Ballesteros, I. & Linacero, R. Changes Induced by Pressure Processing on Immunoreactive Proteins of Tree Nuts. *Molecules* **25**, 954 (2020).
9. Sicherer, S. H. *et al.* Critical issues in food allergy: A national academies consensus report. *Pediatrics* **140**, (2017).
10. Pali-Schöll, I., Untersmayr, E., Klems, M. & Jensen-Jarolim, E. The effect of digestion and digestibility on allergenicity of food. *Nutrients* vol. 10 (2018).
11. Anadón Navarro Elia Teso Canales Miembros del Comité Científico Andreu Palou Oliver, A. *et al.* Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre Alergias Alimentarias.
12. Nwaru, B. I. *et al.* Prevalence of common food allergies in Europe: a systematic review and meta-analysis. *Allergy* **69**, 992–1007 (2014).
13. Sicherer, S. H. & Sampson, H. A. Food allergy: A review and update on epidemiology, pathogenesis, diagnosis, prevention, and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**, 41–58 (2018).
14. Emanuel, M. B. Histamine and the antiallergic antihistamines: a history of their discoveries. *Clinical & Experimental Allergy* **29**, 1–11 (1999).
15. McLean-Tooke, A. P. C., Bethune, C. A., Fay, A. C. & Spickett, G. P. Adrenaline in the treatment of anaphylaxis: what is the evidence? *BMJ (Clinical research ed.)* **327**, 1332–5 (2003).
16. de Silva, D. *et al.* Acute and long-term management of food allergy: Systematic review. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology* vol. 69 159–167 (2014).

17. Breiteneder, H. & Radauer, C. A classification of plant food allergens . *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* 821–830 (2004).
18. Radauer, C. & Breiteneder, H. Evolutionary biology of plant food allergens. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **120**, 518–525 (2007).
19. Ros, E. Health benefits of nut consumption. *Nutrients* **2**, 652–682 (2010).
20. Fernandez Rivas, M. Food allergy in Alergologica-2005. *J Investig Allergol Clin Immunol* **2**, 37–44 (2009).
21. Sicherer, S. H., Muñoz-Furlong, A., Godbold, J. H. & Sampson, H. A. US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, 1322–1326 (2010).
22. Sicherer, S. H., Furlong, T. J., Muñoz-Furlong, A., Burks, A. W. & Sampson, H. A. A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: characteristics of the first 5149 registrants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**, 128-132. (2001).
23. Zhou, Y. *et al.* Peanut Allergy, Allergen Composition, and Methods of Reducing Allergenicity: A Review. *International Journal of Food Science* **2013**, 1–8 (2013).
24. Bonds, R. S., Midoro-Horiuti, T. & Goldblum, R. A structural basis for food allergy: the role of cross-reactivity. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **8**, 82–86 (2008).
25. Costa, J., Silva, I., Vicente, A. A., Oliveira, M. B. P. P. & Mafra, I. Pistachio nut allergy: An updated overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 546–562 (2019).
26. Ahn, K. Ñ., Bardina, L. Ñ., Grishina, G. Ñ., Beyer, K. & Sampson, H. A. Ñ. Identification of two pistachio allergens , Pis v 1 and Pis v 2 , belonging to the 2S albumin and 11S globulin family *Clinical & Experimental Allergy*. 926–934 (2009) doi:10.1111/j.1365-2222.2009.03259.x.
27. Willison, L. N. *et al.* Pistachio vicilin, Pis v 3, is immunoglobulin E-reactive and cross-reacts with the homologous cashew allergen, Ana o 1. *Clinical & Experimental Allergy* **38**, 1229–1238 (2008).
28. Beyer, K., Grishina, G., Bardina, L., Stalcup, D., & Sampson, H. Identification and cloning of 11S globulin, a new minor allergen from pistachio nut. Allergen nomenclature sub-committee of the International Union of Immunological Societies, and to the EMBL/GenBank/DDBJ databases. (2008).
29. Weinberger, T. & Sicherer, S. Current perspectives on tree nut allergy: a review. *Journal of Asthma and Allergy* **Volume 11**, 41–51 (2018).
30. Clark, A. T., Anagnostou, K. & Ewan, P. W. Cashew nut causes more severe reactions than peanut: case matched comparison in 141 children. *Allergy* **62**, 913–916 (2007).
31. Wang, F. *et al.* Ana o 1, a cashew (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the vicilin seed storage protein family. *J Allergy Clin Immunol* **110**, 160–166 (2002).
32. Wang, F., Robotham, J. M., Teuber, S. S., Sathe, S. K. & Roux, K. H. Ana o 2, a Major Cashew (<i>Anacardium occidentale</i> L.) Nut Allergen of the Legumin Family. *International Archives of Allergy and Immunology* **132**, 27–39 (2003).
33. Robotham, J. M. *et al.* Ana o 3, an important cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) allergen of the 2S albumin family. *J ALLERGY CLIN IMMUNOL* **115**, 1284–1290 (2005).

34. Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I. & Oliveira, M. B. P. P. Hazelnut allergens: Molecular characterization, detection, and clinical relevance. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **56**, 2579–2605 (2016).
35. Miguel Fuentes Pérez, J., Esmeralda Nancy Jiménez Polvo, D., Alejandro Mendoza Hernández, D. & Guadalupe Huerta López, J. *Anafi laxia secundaria a ingesta de avellana: reporte de un caso*. vol. 25
www.medigraphic.org.mxEsteartículopuedeserconsultadoenversióncompletaenhttp://www.medigraphic.com/alergia/ (2016).
36. Flinterman, A. E., Akkerdaas, J. H., Knulst, A. C., van Ree, R. & Pasmans, S. G. Hazelnut allergy: from pollen-associated mild allergy to severe anaphylactic reactions. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* **8**, 261–265 (2008).
37. Hansen, K. S. *et al.* Component-resolved in vitro diagnosis of hazelnut allergy in Europe. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **123**, 1134-1141.e3 (2009).
38. Szikriszt, B., Hegedűs, A. & Halász, J. Review of genetic diversity studies in almond (*Prunus dulcis*). *Acta Agronomica Hungarica* **59**, 379–395 (2011).
39. Sicherer, S. H., Furlong, T. J., Muñoz-Furlong, A., Burks, A. W. & Sampson, H. A. A voluntary registry for peanut and tree nut allergy: Characteristics of the first 5149 registrants. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **108**, 128–132 (2001).
40. Costa, J., Mafra, I., Carrapatoso, I. & Oliveira, M. B. P. P. Almond allergens: Molecular characterization, detection, and clinical relevance. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* vol. 60 1337–1349 (2012).
41. Che, H. *et al.* Almond (*Prunus dulcis*) Allergen Pru du 8, the First Member of a New Family of Food Allergens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **67**, 8626–8631 (2019).
42. Zhang, Y. & Jin, T. Almond allergens: update and perspective on identification and characterization. *Journal of the Science of Food and Agriculture* (2020) doi:10.1002/jsfa.10417.
43. Meshram, A., Singhal, G., Bhagyawant, S. S. & Srivastava, N. Plant-Derived Enzymes: A Treasure for Food Biotechnology. *Enzymes in Food Biotechnology* 483–502 (2019) doi:10.1016/B978-0-12-813280-7.00028-1.
44. Los, D. E., de Procesado, M. & Carrillo, W. *ALERGIAS ALIMENTARIAS Y LA INFLUENCIA Alergias alimentarias y la influencia de los métodos de procesado Food allergies and the influence of processing methods*.
http://www.revistasan.org.ar/pdf_files/trabajos/vol_14/num_4/RSAN_14_4_307.pdf.
45. Wal, J. M. Thermal processing and allergenicity of foods. *Allergy* **58**, 727–729 (2003).
46. Cabanillas, B. & Novak, N. Effects of daily food processing on allergenicity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **59**, 31–42 (2019).
47. Cuadrado, C. *et al.* Influence of thermal processing on IgE reactivity to lentil and chickpea proteins. *Molecular Nutrition & Food Research* **53**, 1462–1468 (2009).
48. Thomas, K. *et al.* Evaluating the effect of food processing on the potential human allergenicity of novel proteins: International workshop report. *Food and Chemical Toxicology* **45**, 1116–1122 (2007).
49. López, E. *et al.* Effects of autoclaving and high pressure on allergenicity of hazelnut proteins. *Journal of Clinical Bioinformatics* **2**, 12 (2012).

50. Sanchiz, A. *et al.* Thermal processing effects on the IgE-reactivity of cashew and pistachio. *Food Chemistry* **245**, 595–602 (2018).
51. Sathe, S. K. & Sharma, G. M. Review Effects of food processing on food allergens. 970–978 (2009) doi:10.1002/mnfr.200800194.
52. Cabanillas, B. *et al.* Potential changes in the allergenicity of three forms of peanut after thermal processing. *Food Chem* **183**, 18–25 (2015).
53. Haddad, J., Louka, N., Gadouleau, M., Juhel, F. & Allaf, K. Application du nouveau procédé de séchage/texturation par Détente Instantanée Contrôlée DIC aux poissons: Impact sur les caractéristiques physico-chimiques du produit fini. *Science des Aliments* **21**, 481–498 (2001).
54. Haddad, J. & Allaf, K. A study of the impact of instantaneous controlled pressure drop on the trypsin inhibitors of soybean. *Journal of Food Engineering* **79**, 353–357 (2007).
55. Cuadrado, C. *et al.* Effect of instant controlled pressure drop on ige antibody reactivity to peanut, lentil, chickpea and soybean proteins. *International Archives of Allergy and Immunology* **156**, 397–404 (2011).
56. Takacs, K. *et al.* Study of the effect of instant controlled pressure drop (DIC) treatment on IgE-reactive legume-protein patterns by electrophoresis and immunoblot. *Food and Agricultural Immunology* **25**, 173–185 (2014).
57. Vicente, F. *et al.* Influence of Instant Controlled Pressure Drop (DIC) on Allergenic Potential of Tree Nuts. *Preprints* (2020) doi:10.20944/PREPRINTS202002.0204.V2.
58. Yordanov, D. G. & Angelova, G. v. High pressure processing for foods preserving. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* vol. 24 1940–1945 (2010).
59. Huang, H.-W., Hsu, C.-P., Yang, B. B. & Wang, C.-Y. Potential Utility of High-Pressure Processing to Address the Risk of Food Allergen Concerns. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* **13**, 78–90 (2014).
60. Somkuti, J. & Smeller, L. High pressure effects on allergen food proteins. *Biophysical Chemistry* **183**, 19–29 (2013).
61. Hu, C. *et al.* High-pressure microfluidisation-induced changes in the antigenicity and conformation of allergen Ara h 2 purified from Chinese peanut. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **91**, 1304–1309 (2011).
62. Prieto, N. *et al.* A Novel Proteomic Analysis of the Modifications Induced by High Hydrostatic Pressure on Hazelnut Water-Soluble Proteins. *Foods* **3**, 279–289 (2014).
63. Terheggen-Lagro, S. W. J., Khouw, I. M. S. L., Schaafsma, A. & Wauters, E. A. K. Safety of a new extensively hydrolysed formula in children with cow's milk protein allergy: A double blind crossover study. *BMC Pediatrics* **2**, 1–7 (2002).
64. Cuadrado, C. *et al.* Influence of enzymatic hydrolysis on the allergenic reactivity of processed cashew and pistachio. *Food Chemistry* **241**, 372–379 (2018).
65. Cabanillas, B. *et al.* Effects of enzymatic hydrolysis on lentil allergenicity. *Molecular Nutrition & Food Research* **54**, 1266–1272 (2010).
66. Cabanillas, B. *et al.* Influence of Enzymatic Hydrolysis on the Allergenicity of Roasted Peanut Protein Extract. *Int Arch Allergy Immunol* **157**, 41–50 (2012).

67. Gámez, C. *et al.* Simulated gastrointestinal digestion reduces the allergic reactivity of shrimp extract proteins and tropomyosin. *Food Chemistry* **173**, 475–481 (2015).
68. Omi, Y., Kato, T., Ishida, K.-I., Kato, H. & Matsuda, T. Pressure-Induced Release of Basic 7S Globulin from Cotyledon Dermal Tissue of Soybean Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**, 3763–3767 (1996).
69. Kato, T., Katayama, E., Matsubara, S., Omi, Y. & Matsuda, T. Release of allergenic proteins from rice grains induced by high hydrostatic pressure. *J Agric Food Chem* **48**, 3124–3129 (2000).
70. Ewan, P. W. & Coote, D. Evaluation of a capsulated hydrophilic carrier polymer (the ImmunoCAP) for measurement of specific IgE antibodies. *Allergy* **45**, 22–29 (1990).
71. Carrillo, W. Alergias alimentarias y la influencia de los métodos de procesado. *Actualización en Nutrición (SAN)* **14**, 307–313 (2013).
72. *Instant Controlled Pressure Drop (D.I.C.) in Food Processing*. (Springer New York, 2014). doi:10.1007/978-1-4614-8669-5.
73. Beyer, K. *et al.* Effects of cooking methods on peanut allergenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **107**, 1077–1081 (2001).
74. Krause, S. *et al.* Lipid transfer protein (Ara h 9) as a new peanut allergen relevant for a Mediterranean allergic population. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **124**, 771-778.e5 (2009).
75. Shi, X. *et al.* Allergenic Properties of Enzymatically Hydrolyzed Peanut Flour Extracts. *International Archives of Allergy and Immunology* **162**, 123–130 (2013).
76. Guillamón, E. *et al.* Effect of an instantaneous controlled pressure drop on in vitro allergenicity to lupins (*Lupinus albus* var Multolupa). *Int Arch Allergy Immunol* **145**, 9–14 (2008).
77. Mills, E. N. C. *et al.* Allergens of the cupin superfamily. *Biochemical Society Transactions* **30**, 925–929 (2004).
78. Venkatachalam, M. *et al.* Effects of processing on immunoreactivity of cashew nut (*Anacardium occidentale* L.) seed flour proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**, 8998–9005 (2008).
79. Zhang, Y., Zhang, J., Sheng, W., Wang, S. & Fu, T. J. Effects of heat and high-pressure treatments on the solubility and immunoreactivity of almond proteins. *Food Chemistry* **199**, 856–861 (2016).
80. Li, Y. *et al.* Effect of Pulsed Ultraviolet Light and High Hydrostatic Pressure on the Antigenicity of Almond Protein Extracts. *Food and Bioprocess Technology* **6**, 431–440 (2013).
81. Blanco, D., de Las Cuevas, N., Barranco, R., Fernandez Crespo, J. F. & Dieguez, M. C. Effects of Pressure and Thermal Processing on Cashew and Pistachio in vitro Allergic Reactivity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **141**, AB243 (2018).
82. Bueno-Díaz, C. *et al.* Seed storage 2S albumins are predictive indicators of exclusive Anacardiaceae cross-reactivity. *Clinical & Experimental Allergy* **49**, 545–549 (2019).
83. Costa, J., Silva, I., Vicente, A. A., Oliveira, M. B. P. P. & Mafra, I. Pistachio nut allergy: An updated overview. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 1–17 (2017) doi:10.1080/10408398.2017.1379947.

84. Lange, L. *et al.* Ana o 3-specific IgE is a good predictor for clinically relevant cashew allergy in children. *Allergy* **72**, 598–603 (2017).
85. Arndt, C., Koristka, S., Bartsch, H. & Bachmann, M. Native polyacrylamide gels. *Methods in Molecular Biology* **869**, 49–53 (2012).
86. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680 (1970).
87. Nelson, D. R., Lehninger, A. L. & Cox, M. *Lehninger principles of biochemistry*. (Teney, Sarah, 2005).
88. Gallagher, S. R. One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology* **75**, 10.2.1-10.2A.37 (2006).
89. Cunsolo, V., Muccilli, V., Saletti, R. & Foti, S. Mass spectrometry in food proteomics: a tutorial. *Journal of Mass Spectrometry* **49**, 768–784 (2014).
90. Monaci, L., Pilolli, R., de Angelis, E. & Mamone, G. Mass spectrometry in food allergen research. in *Comprehensive Analytical Chemistry* vol. 68 359–393 (Elsevier B.V., 2015).
91. Perkins, D. N., Pappin, D. J. C., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *ELECTROPHORESIS* **20**, 3551–3567 (1999).
92. Mattison, C. P. *et al.* Heat-induced alterations in cashew allergen solubility and IgE binding. *Toxicology Reports* **3**, 244–251 (2016).
93. Novak, N., Haberstock, J., Bieber, T. & Allam, J.-P. The immune privilege of the oral mucosa. *Trends in Molecular Medicine* **14**, 191–198 (2008).
94. Alonso-Lebrero, E., Zapatero-Remón, L. & Fuentes-Aparicio, V. *Alergia a alimentos: nuevos modelos terapéuticos Puntos clave*. <http://www.apcontinuada.com>.
95. Muraro, A. *et al.* Anaphylaxis: guidelines from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *Allergy* **69**, 1026–1045 (2014).
96. Sun, N., Zhou, C., Zhou, X., Sun, L. & Che, H. Use of a rat basophil leukemia (RBL) cell-based immunological assay for allergen identification, clinical diagnosis of allergy, and identification of anti-allergy agents for use in immunotherapy. *Journal of Immunotoxicology* **12**, 199–205 (2015).