

REPORT SCIENTIFICO DI EFSA

Review del potenziale effetto sulla salute delle β -casomorfine e dei peptidi correlati¹

Report del DATEX Working Group sulle β -casomorfine

(Question N° EFSA-Q-2008-379)

Pubblicato il 29 Gennaio 2009

Componenti del Gruppo di Lavoro

Ivano De Noni, Richard J. FitzGerald, Hannu J. T. Korhonen, Yves Le Roux, Chris T. Livesey, Inga Thorsdottir, Daniel Tomé, Renger Witkamp.

SOMMARIO

Le proteine sono una famiglia molto eterogenea di grandi composti organici coinvolti in molti processi biologici importanti. In seguito alla loro idrolisi enzimatica durante la trasformazione o la digestione degli alimenti, le proteine possono liberare frammenti dalla loro sequenza aminoacidica primaria. Questi frammenti sono chiamati peptidi e molti di essi sono noti per essere fisiologicamente attivi. I possibili effetti benefici dei peptidi bioattivi hanno attirato, negli ultimi anni, l'interesse di molti. D'altro canto, ci sono anche dei report che suggeriscono che alcuni peptidi derivati dagli alimenti potrebbero incidere negativamente sulla salute umana. Tra questi peptidi è stato ipotizzato che la β -casomorfina 7 (BCM7), una frazione aminoacidica presente nella β -caseina del latte, contribuirebbe ad un aumento del rischio di sviluppare alcune malattie non trasmissibili come l'autismo, le malattie cardiovascolari e il diabete di tipo I. Alcuni dati in letteratura hanno proposto possibili spiegazioni meccanicistiche riguardo tali associazioni. Riconoscendo il presunto effetto negativo della BCM7 sulla salute umana, l'EFSA ha ritenuto necessario effettuare una revisione completa della letteratura scientifica pubblicata al fine di valutare la correlazione tra questo peptide, i suoi peptidi correlati e le malattie non trasmissibili. La review affronta i seguenti aspetti: le possibili fonti di β -casomorfine (BCMS) e dei peptidi correlati, il polimorfismo della β -caseina, la presenza di BCM e dei peptidi correlati negli alimenti prima della digestione, la formazione di BCM7 e dei peptidi correlati durante la digestione umana e le possibili interazioni molecolari di questi peptidi con l'ambiente dell'ospite. Inoltre, esso tiene conto anche dell'assorbimento e del destino di questi

¹Per le citazioni: Relazione scientifica dell'EFSA, DATEX Working Group sul potenziale impatto sulla salute delle β -casomorfine e dei peptidi correlati. EFSA Scientific Report (2009) 231, 1-107

peptidi, compresi i loro possibili meccanismi di passaggio attraverso l'epitelio intestinale, il trasporto nel flusso sanguigno e il passaggio attraverso la barriera ematoencefalica. Infine, sono stati rivisti i possibili e specifici effetti su organi e apparati, con particolare attenzione riguardo il sistema gastrointestinale, il sistema nervoso centrale, quello cardiovascolare e la connessione suggerita con il diabete di tipo 1. Questa review afferma che le proteine, comprese quelle presenti nella dieta, sono la potenziale fonte di una vasta gamma di peptidi biologicamente attivi, tra i quali ce ne sono alcuni con affinità per i recettori degli oppioidi. Questi ultimi sono noti anche come peptidi oppioidi. Sequenze di peptidi oppioidi sono state identificate in proteine animali e vegetali. Fino ad oggi la maggior parte del lavoro si è concentrata sulla caratterizzazione di peptidi oppioidi derivati dalle proteine del latte, in particolare dalle caseine. Le β -casomorfine sono un gruppo di peptidi oppioidi che possono essere rilasciati dalla β -caseina. Il peptide derivato dalla β -caseina con la sequenza Tyr⁶⁰-Pro⁶¹-Phe⁶²-Pro⁶³-Gly⁶⁴-Pro⁶⁵-Ile⁶⁶ è conosciuto come β -casomorfina 7 (BCM7). Il rilascio di BCM7 mediante digestione enzimatica della β -caseina bovina è dettato dalle diverse sequenze aminoacidiche di questa proteina. Le sequenze variano geneticamente tra le razze bovine. L'aminoacido presente in posizione 67 nella sequenza della β -caseina, sembra essere il punto critico per il rilascio di BCM7. Nella variante A² della β -caseina si riscontra un residuo di prolina in posizione 67 mentre, nelle varianti A¹ e B di β -caseina, c'è un residuo di istidina in questa posizione. Nel caso delle varianti che contengono prolina, l'idrolisi enzimatica del legame Ile⁶⁶-Pro⁶⁷ non si verifica o si verifica con una frequenza molto bassa. Il rapporto delle diverse varianti proteiche espresse nel latte, compresa quella della β -caseina, è legato alle loro distribuzioni alleliche nella diverse razze e popolazioni bovine. Il cambiamento degli obiettivi di selezione degli ultimi decenni ha portato, nella maggior parte dei paesi europei, ad una modificazione nella composizione delle razze bovine. Anche se non sono disponibili informazioni dettagliate, è probabile che questi cambiamenti nella composizione genetica delle razze abbiano avuto un impatto anche sulla composizione del latte, incluso sulle varianti della proteina. Tenendo conto della mancanza di una conoscenza dettagliata della composizione delle varianti proteiche del latte e della diversa provenienza geografica dei prodotti lattiero-caseari e degli ingredienti di tutta l'Europa, attualmente non sono disponibili informazioni sufficienti sull'esposizione dei consumatori alle diverse varianti di β -caseina. Sembrerebbe che il latte fresco crudo non lavorato, ottenuto da vacche sane, non contenga BCM7 o peptidi correlati. Per contro, c'è un numero consistente di prove che indicano che i diversi sistemi proteolitici coinvolti nella produzione di latte fermentato o di formaggio possono potenzialmente favorire l'idrolisi della β -caseina a BCM7 o ad altre BCM e, in seguito, degradare questi peptidi in catene più corte e anche in amminoacidi. Comunque,

attualmente non abbiamo a disposizione molte informazioni riguardo i livelli reali di BCM che possono essere generati, dai diversi sistemi proteolitici, nei latticini fermentati o trattati con enzimi. Oltretutto, la stabilità di questi peptidi nei prodotti alimentari, una volta prodotti, è variabile. Alcuni trattamenti tecnologici, come quelli termici, applicati durante la trasformazione casearia industriale non sembrano influenzare l'insorgenza di BCM nei prodotti finali o la loro formazione durante la successiva digestione. Inoltre, abbiamo limitate informazioni disponibili riguardo la presenza di BCM negli alimenti commerciali per lattanti. Il ruolo dei meccanismi proteolitici nel rilascio di BCM durante la digestione gastrointestinale simulata (SGID) o nella digestione vivo, non è stato chiarito completamente. Nessuno studio attuale riporta i valori quantitativi della formazione di BCM durante la digestione in vivo dei latticini. Tuttavia, ci sono indicazioni sul fatto che potrebbe essere coinvolta l'azione sequenziale di diversi enzimi digestivi ed è stata dimostrata la formazione di alcuni BCM dopo SGID (con molteplici attività enzimatiche). I dati sugli animali indicano chiaramente che le BCM, tra cui la BCM7, possono agire come agonisti dei recettori degli oppioidi, probabilmente agendo tramite i recettori μ degli oppioidi. Tuttavia, nella maggior parte se non in tutti gli studi fatti fino ad oggi sugli animali, gli effetti di tipo oppioide della BCM7 e dei relativi peptidi derivati dal latte sono stati osservati in vivo solo in seguito a somministrazione intraperitoneale (i.p.) o intracerebroventricolare (i.c.v.). In confronto agli oppioidi endogeni e sintetici, la BCM7 bovina non sembra essere un ligando molto potente degli oppioidi. Un prerequisito per il manifestarsi dell'attività oppioide, dopo l'ingestione orale, è che i peptidi passino la barriera epiteliale intestinale. Inoltre, anche la successiva biotrasformazione epatica e la stabilità nel plasma possono essere fattori in grado di determinare una maggior attività biologica. Infine, in linea di principio, è necessario il passaggio della barriera ematoencefalica per un'attività a livello del sistema nervoso centrale. Si sa relativamente poco sui meccanismi di trasferimento dei peptidi intatti (più lunghi di 3 aminoacidi) attraverso la barriera epiteliale intestinale. Se questo trasporto si dovesse verificare è perché la lunghezza è molto ridotta e si è ipotizzato che la diffusione passiva sia il meccanismo di trasferimento più plausibile. In due studi su cani neonati e vitelli è stata segnalata la presenza nel sangue di materiale immunoreattivo per β -casomorfina. Tuttavia, in studi in vivo, non è stata evidenziata nel sangue la presenza di molecole intatte di β -casomorfina dopo l'assunzione di latte o di caseina. I peptidi oppioidi, tra cui le β -casomorfine 4, 5 e 7 sono molto sensibili all'idrolisi da parte della dipeptidil-peptidasi IV limitando o impedendo, in tal modo, il passaggio di questi peptidi in forma inalterata attraverso la mucosa intestinale e la barriera ematoencefalica. In linea di principio, i dati disponibili suggeriscono che è possibile un passaggio di peptidi e proteine di origine alimentare attraverso la mucosa intestinale

umana. Tuttavia, i dati quantitativi riguardo questo fenomeno sono insufficienti. In alcuni casi, come nei neonati e negli adulti con malattie specifiche, è stata segnalata una permeabilità intestinale notevolmente aumentata. In linea generale, la review non ha individuato alcun dato quantitativo per quanto riguarda l'assorbimento dei peptidi bioattivi intatti negli adulti, salvo nel caso di alcuni di- e tri-peptidi con appurate proprietà anti-ipertensive. I peptidi derivati dall'alimentazione, tra cui le casomorfine, possono avere effetti diversi sul lume e sulla mucosa intestinale, tra cui effetti regolatori sulla motilità gastrointestinale e sulle secrezioni gastriche e pancreatiche. Molti studi riportano gli effetti delle β -casomorfine sul sistema nervoso centrale (SNC) in seguito a somministrazione i.p. o i.c.v. negli animali. In alcune pubblicazioni è stato suggerito un possibile collegamento tra l'assunzione di BCM e la sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS). Tuttavia, durante la revisione, non è stata trovata alcuna prova chiara di tale rapporto. I meccanismi proposti sono stati considerati piuttosto ipotetici e in parte contraddittori. Analogamente, è stato suggerito anche un collegamento tra i peptidi derivati dalla caseina e l'autismo in soggetti con aumentata permeabilità intestinale. Tuttavia, dati recenti non forniscono alcun supporto riguardo tale correlazione. È stato suggerito che la BCM7 potrebbe essere aterogena in seguito ad un'azione ossidativa sull' LDL. Questo meccanismo è stato originariamente proposto solo da un unico report; comunque, non è stato confermato da studi successivi. Al contrario, numerosi studi in vitro indicano che molti peptidi derivati o idrolizzati dagli alimenti mostrano un'attività antiossidante. La possibilità che la BCM7 possa contribuire ad un aumento del rischio di aterosclerosi è stato suggerito anche da uno studio condotto su un modello animale di coniglio. Questo studio ha concluso che la β -caseina A¹ sarebbe, rispetto alla β -caseina A², aterogena. Tuttavia, durante la revisione, la validità del modello sperimentale e la conclusione tratta sull'aterosclerosi negli esseri umani non sono stati considerati così convincenti. Ulteriori ipotesi sull'associazione tra l'assunzione di BCM7 e la mortalità cardiovascolare sono state riportate come risultato di studi ecologici. Però, questi studi ecologici non hanno tenuto conto di diversi fattori confondenti. Inoltre, recenti e ampi studi di coorte hanno portato a conclusioni opposte. Due studi di intervento sull'uomo, che hanno messo a confronto diete contenenti β -caseina A¹ e A², non hanno mostrato l'esistenza di una correlazione tra il consumo stimato di β -caseina A¹ e lo sviluppo di alcuni biomarcatori di malattie cardiovascolari (CVD). Uno dei limiti di questi studi è stato l'esiguo numero di soggetti e il breve periodo d' intervento. Nel complesso, questo processo di revisione non ha trovato alcuna prova abbastanza evidente di un legame tra il consumo di β -caseina A¹ e un aumento del rischio di malattie cardiovascolari negli esseri umani. Il diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) è riconosciuto come una malattia autoimmune multifattoriale; tuttavia, la sua patogenesi

non è ancora chiara. Nei pazienti con IDDM sono stati trovati autoanticorpi, ma il loro ruolo nel diabete di tipo 1 non è al momento noto. Questi autoanticorpi hanno dimostrato di non essere direttamente coinvolti né nella distruzione del tessuto né nella progressione della malattia. Lo sviluppo di IDDM è il risultato di una combinazione tra predisposizione genetica e fattori di rischio ambientale (dove la predisposizione genetica è un aspetto fondamentale). Sono stati suggeriti molteplici fattori di rischio alimentare per il IDDM, tra cui la breve durata dell'allattamento al seno così come la somministrazione di glutine, soia, latte bovino e di altri cibi solidi in giovane età. Numerose e svariate proteine del latte, o peptidi derivati da queste, sono state identificate come possibili fattori diabetogeni. Il meccanismo suggerito più spesso è di tipo immunologico. La diabetogenicità di β -caseina A1, A2 e B è stata valutata in studi animali e in studi ecologici su esseri umani. Gli studi animali hanno mostrato risultati contraddittori. Alcuni studi ecologici hanno collegato l'assunzione di BCM7 all'IDDM. Gli studi ecologici hanno il difetto di essere incapaci di stabilire un nesso causa-effetto e non possono essere corretti per eventuali fattori confondenti. Essi sono, nel migliore dei casi, in grado di indicare un'ipotesi, ma non sono capaci di fornire una base adeguata per la dimostrazione di un rapporto di causa-effetto. Le correlazioni suggerite da tali studi possono diventare molto deboli se teniamo conto delle incertezze sul consumo individuale, sulla composizione della variante di β -caseina e, in alcuni paesi, anche del tasso di incidenza dell'IDDM. Inoltre la differenza nel contenuto di β -caseina A¹+B nel latte prodotto nei paesi ad alta o a bassa prevalenza di IDDM, appare relativamente piccola e non spiega, dal punto di vista immunologico, la differenza riguardo la diversa incidenza di IDDM tra i vari paesi. Sulla base della presente review fatta sulla letteratura scientifica disponibile, non può essere stabilito un rapporto di causa-effetto tra l'assunzione orale di BCM7, o di peptidi correlati, e l'eziologia, o il decorso, di qualsiasi altra malattia non trasmissibile suggerita. Di conseguenza, non è raccomandata una valutazione formale del rischio da parte dell'EFSA sui peptidi derivati dagli alimenti.

Parole chiave: peptidi derivati dagli alimenti, peptidi oppioidi, β -caseina, β -casomorfina, β -casomorfina7, IDDM, CVD, SIDS, autismo

CONCLUSIONI

Conclusioni sui peptidi bioattivi e sulle fonti proteiche

- Le proteine, comprese quelle presenti nella dieta, sono una potenziale fonte di una vasta gamma di peptidi biologicamente attivi, tra cui alcuni con affinità per i recettori oppioidi.
- Il rilascio di BCM7 mediante digestione enzimatica della β -caseina bovina è dettato dalla sequenza aminoacidica primaria, che dipende dalla variante genetica di questa proteina.
- La distribuzione delle frequenze alleliche della β -caseina è determinata dalla razza bovina e dalla popolazione.
- Il cambiamento degli obiettivi di selezione degli ultimi decenni ha portato a dei cambiamenti nella composizione genetica delle razze bovine nella maggior parte dei paesi europei. Anche se non sono disponibili informazioni dettagliate, è probabile che questi cambiamenti abbiano avuto un impatto sulla composizione del latte, compresa la concentrazione e la tipologia delle diverse varianti proteiche.
- Tenendo conto dell'incertezza riguardo la composizione del latte e la diversa geografia dell'origine dei prodotti lattiero-caseari e degli ingredienti provenienti da tutta l'Europa, attualmente sono disponibili informazioni insufficienti riguardo l'esposizione dei consumatori alle diverse varianti di β -caseina.

Conclusioni sui peptidi oppioidi negli alimenti e sulla loro formazione durante la digestione

- La presenza di BCM o di peptidi correlati nel latte crudo non lavorato, ottenuto da bovine sane, non è stata definitivamente dimostrata.
- C'è un consistente insieme di prove che indicano che i diversi sistemi proteolitici, coinvolti nella produzione del latte fermentato o del formaggio, possono potenzialmente idrolizzare la β -caseina a BCM7 o ad altre BCM e possono degradare ulteriormente questi peptidi in peptidi a catena più corta e anche in aminoacidi.
- Poca o nessuna informazione è attualmente disponibile sui livelli reali di BCM che i diversi sistemi proteolitici possono generare nei latticini fermentati o trattati con enzimi. Inoltre la stabilità di questi peptidi, una volta generati, è variabile.
- Aspetti tecnologici, quali i trattamenti termici applicati all'atto della trasformazione casearia industriale, non sembrano influenzare l'insorgenza di BCM nei prodotti finali o la loro formazione durante la successiva digestione.
- Il ruolo dei sistemi proteolitici nel favorire il rilascio di BCM durante la SGID o la digestione in vivo, eventualmente mediante la formazione di precursori della

BCM, non è stato chiarito. Tuttavia, ci sono indicazioni riguardo il successivo coinvolgimento di numerosi enzimi digestivi.

- Le prove riguardo la presenza di BCM negli alimenti commerciali per lattanti sono attualmente inconcludenti. Tuttavia, in vivo, è stata dimostrata la formazione di alcuni BCM negli alimenti per lattanti dopo SGID (con svariate attività enzimatiche).
- Non ci sono studi in corso che riportino i valori quantitativi di BCM formatasi durante la digestione in vivo dei latticini.

Conclusioni sulle interazioni molecolari, sugli effetti biologici generali e sul destino de peptidi di origine alimentare

- I dati sugli animali supportano chiaramente l'idea che le β -casomorfine, tra cui la BCM7, possano fungere da agonisti dei recettori per gli oppioidi, probabilmente agendo tramite il recettore μ degli oppioidi.
- A livello molecolare, in confronto agli oppioidi endogeni e sintetici, la BCM7 bovina non sembra essere un ligando molto potente per gli oppioidi.
- Gli effetti di tipo oppioide sono stati osservati solo in vivo negli studi sugli animali in seguito a somministrazione intraperitoneale (I.p.) o intracerebroventricolare (i.c.v.).
- Si sa relativamente poco sui meccanismi di trasferimento dei peptidi intatti (lunghi più di 3 aminoacidi) attraverso la barriera intestinale; Tuttavia, se questo trasporto si verifica, la sua entità è allora molto bassa e la diffusione passiva è il meccanismo di trasferimento più probabile.
- Materiale immunoreattivo per la β -casomorfina è stato riscontrato in due studi fatti nel sangue di cani neonati e vitelli. Tuttavia, la presenza nel sangue di molecole di β -casomorfina, dopo l'assunzione di latte o di caseina, non è stata evidenziata in studi in vivo.
- Peptidi oppioidi, tra cui la β -casomorfina 4, 5 e 7 sono molto sensibili all'idrolisi mediata dalla dipeptidil-peptidasi IV limitando o impedendo, in tal modo, il passaggio di questi peptidi in forma inalterata attraverso la mucosa intestinale e la barriera ematoencefalica.
- I dati disponibili indicano che, in linea di principio, è possibile il trasporto di peptidi e di proteine di derivazione alimentare attraverso la mucosa intestinale umana. Tuttavia, mancano dati quantitativi su questo fenomeno. In alcuni casi, come nei neonati e negli adulti con specifiche malattie, è stato segnalato che la permeabilità intestinale è notevolmente aumentata.

Conclusioni sulle azioni specifiche su organi e apparati

- I peptidi derivati dagli alimenti, tra cui le casomorfine, possono avere effetti diversi nel lume e nella mucosa intestinale, tra cui effetti regolatori sulla motilità gastrointestinale e sulle secrezioni gastriche e pancreatiche.
- Molti studi riportano effetti delle β -casomorfine sul sistema nervoso centrale in seguito a somministrazioni per via intraperitoneale o i.c.v. negli animali.
- In alcune pubblicazioni è stato suggerito un possibile legame tra l'assunzione di BCM e la sindrome della morte improvvisa del lattante (SIDS). Tuttavia, nessuna prova chiara di tale rapporto è stata rilevata durante la review.
- È stato suggerito un collegamento tra i peptidi derivati dalla caseina e l'autismo in soggetti con un'aumentata permeabilità intestinale. Tuttavia, dati recenti non forniscono alcun supporto riguardo tale rapporto.
- È stato ipotizzato che la BCM7 potrebbe essere aterogena mediante un'azione ossidativa sull' LDL. Questo meccanismo è stato originariamente proposto in un unico report, ma non è stato confermato da studi successivi.
- La possibilità che la BCM7 possa contribuire ad un aumento del rischio di aterosclerosi è stato suggerito anche da uno studio in un modello animale su coniglio. Questo studio ha concluso che la β -caseina A¹ sarebbe aterogena, rispetto alla β -caseina A². Tuttavia, la validità del modello sperimentale e la conclusione tratta riguardo l'aterosclerosi negli esseri umani non sono stati considerati così convincenti.
- Alcuni studi ecologici hanno collegato l'assunzione di BCM7 con la mortalità causata da malattia cardiovascolare. Tuttavia, questi studi ecologici non tengono conto di diversi fattori confondenti. Inoltre, recenti e più numerosi studi di coorte hanno portato a conclusioni opposte.
- Due studi di intervento sull'uomo, che hanno messo a confronto diete contenenti β -caseina A¹ e A², non hanno mostrato l'esistenza di una correlazione tra il consumo stimato di β -caseina A¹ e lo sviluppo di alcuni biomarcatori di malattie cardiovascolari (CVD). Un limite di questi studi è stato il piccolo numero di soggetti e il periodo di intervento breve.
- Nel complesso, questo processo di revisione non ha trovato alcuna prova schiacciante dell'evidenza di un legame tra il consumo di β -caseina A¹ e l'aumentato rischio di malattie cardiovascolari negli esseri umani.
- Il diabete mellito insulino-dipendente (IDDM) è riconosciuto come una malattia autoimmune multifattoriale; tuttavia, la sua patogenesi non è chiara.
- Nei pazienti con IDDM sono stati trovati autoanticorpi, ma il loro ruolo nel diabete di tipo 1 non è al momento noto. Questi autoanticorpi hanno dimostrato di non essere direttamente coinvolti né nella distruzione del tessuto né nella progressione della malattia.

- Lo sviluppo di IDDM è il risultato di una combinazione tra predisposizione genetica e fattori di rischio ambientale (dove la predisposizione genetica è un aspetto fondamentale).
- Sono stati suggeriti molteplici fattori di rischio alimentare per il IDDM, tra cui la breve durata dell'allattamento al seno così come la somministrazione di glutine, soia, latte bovino e di altri cibi solidi in giovane età.
- Numerose e varie proteine del latte o peptidi derivati da queste, sono state identificate come possibili fattori diabetogeni. Il meccanismo suggerito più spesso è di tipo immunologico.
- La diabetogenicità di β -caseina A1, A2 e B è stata valutata in studi animali e in studi ecologici su esseri umani. Gli studi animali hanno mostrato risultati contraddittori.
- Alcuni studi ecologici hanno collegato l'assunzione di BCM7 con il IDDM. Gli studi ecologici hanno il difetto di essere incapaci di stabilire un nesso causa-effetto e non possono essere corretti per possibili fattori confondenti. Essi sono, nel migliore dei casi, in grado di indicare un'ipotesi, ma non sono capaci di fornire una base adeguata per la dimostrazione di un rapporto di causa-effetto.
- Le correlazioni suggerite da tali studi possono diventare molto deboli se teniamo conto delle scarse conoscenze sul consumo individuale, sulla composizione della variante di β -caseina e, in alcuni paesi, anche sul tasso di incidenza dell'IDDM.
- La differenza nel contenuto di β -caseina A¹+B nel latte prodotto nei paesi ad alta o a bassa prevalenza di IDDM, appare relativamente piccola e non spiega, dal punto di vista immunologico, la differenza riguardo l'incidenza di IDDM tra i vari paesi.

RACCOMANDAZIONI

Sulla base di questa review della letteratura scientifica disponibile, non può essere stabilito un rapporto di causa-effetto tra l'assunzione orale di BCM7 (o di peptidi correlati) e l'eziologia, o il decorso, di qualsiasi malattia non trasmissibile suggerita. . Di conseguenza, non è raccomandata una valutazione formale del rischio da parte dell'EFSA sui peptidi derivati dagli alimenti.