

da: Davide Caimmi^{1, 2}, Riccardo Castagnoli³, Gian Luigi Marseglia³

¹ Department of Pulmonology - Division of Allergy, Hôpital Arnaud de Villeneuve, University Hospital of Montpellier, F-34295 Montpellier cedex 5, France; ² MACVIA-LR, European Innovation Partnership on Active and Healthy Ageing Reference Site, University Hospital of Montpellier, France; ³ Dipartimento di Scienze Clinico-Chirurgiche, Diagnostiche e Pediatriche Università degli Studi di Pavia.

E-mail: davide.caimmi@gmail.com

Immunomodulating properties of protein hydrolysates for application in cow's milk allergy

M.B. Kiewiet, M. Gros, R.J. van Neerven, M.M. Faas, P. de Vos

Pediatr Allergy Immunol 2015;26:206-17.

Le proteine del latte vaccino causano allergia nel 2-3% dei bambini ¹. Ad oggi, l'unica terapia efficace consiste nell'esclusione dell'alimento dalla dieta. Le manifestazioni allergiche possono essere evitate impiegando per l'alimentazione dei bambini idrolisati proteici, ottenuti tramite la degradazione enzimatica delle proteine intatte. Il razionale di utilizzo degli idrolisati nei pazienti con allergia alle proteine del latte vaccino (APLV) è basato sul riscontro di assenza di sintomi di allergia nei soggetti trattati; tuttavia, i meccanismi alla base di questa tolleranza non sono stati completamente chiariti. Fin dall'iniziale interesse riguardo a questi prodotti, l'effetto ipoalergenico degli idrolisati è stato attribuito alla distruzione mediante idrolisi degli epitopi proteici responsabili dell'induzione della risposta allergica IgE-mediata ². Recenti studi hanno dimostrato un importante ruolo degli idrolisati nella modulazione di meccanismi immunologici, in grado di indurre un effetto ipoallergenico e, in alcuni casi, tollerogenico nei confronti delle proteine del latte vaccino.

In quest'ottica, la review pubblicata dal gruppo olandese di de Vos analizza in maniera esaustiva le più recenti evidenze in merito alle proprietà immunomodulanti degli idrolisati proteici, utilizzati nella dieta dei pazienti con APLV, chiarendo inizialmente i principali meccanismi dell'immunità mucosale intestinale.

Il sistema immunitario gastrointestinale gioca un ruolo fondamentale nella storia naturale dell'allergia alimentare. Numerosi studi hanno dimostrato che tre differenti meccanismi immunologici contribuiscono allo sviluppo della tolleranza verso gli allergeni alimentari a livello della mucosa intestinale. Quando è presente un'alta dose di antigene, i meccanismi principalmente coinvolti sono l'anergia e la delezione dei linfociti T. L'anergia si verifica quando, durante l'interazione tra cellula dendritica presentante l'antigene (APC) e linfocita T, vengono a mancare le molecole co-stimolatrici, con il risultato di ottenere dei linfociti T anergici, incapaci di montare una risposta immunitaria. La delezione clonale consiste nell'apoptosi di cloni linfocitari antigene-specifici in seguito a interazione con cellule NK, prevalentemente attraverso il sistema recettoriale Fas-Fas ligando. Diversamente, in presenza di una ridotta carica antigenica, il principale meccanismo immunologico alla base della tolleranza mucosale è costituito dall'induzione dei linfociti T regolatori (Treg).

La sensibilizzazione a un allergene alimentare si verifica quando uno di questi meccanismi tollerogenici fallisce. In questo modo, gli antigeni alimentari vengono processati dalle cellule presentanti l'antigene (APC) e presentati ai linfociti T, con conseguente sviluppo di una risposta immunitaria di tipo Th2 caratterizzata da un pattern citochinico caratteristico (soprattutto IL-4, IL-5, IL-6), in grado di indurre i linfociti B a maturare in plasmacellule secernenti IgE specifiche, le quali si legano ai recettori ad alta affinità (FcεRI) sulla superficie di mastociti e basofili. La riesposizione all'antigene causa l'accoppiamento dei complessi IgE-FcεRI e la degranolazione dei

mastociti, con sviluppo di una reazione di ipersensibilità immediata ³. Oltre ai linfociti Th2, altre cellule si sono dimostrate fondamentali nel mantenimento dell'omeostasi intestinale; tra queste, le più studiate sono i linfociti Th17 e i linfociti Th22 ⁴.

È stato dimostrato che alcuni peptidi che costituiscono gli idrolisati del latte vaccino sono in grado di influenzare attivamente il sistema immunitario e modulare la risposta allergica ⁵. Tuttavia, il meccanismo attraverso il quale tali peptidi svolgano la loro azione tollerogena deve essere ulteriormente indagato. Attualmente, si ipotizza che l'azione di queste molecole venga esplicata attraverso l'interazione ligando-recettore. Già nel 1992, uno studio di Jarizi et al. ha evidenziato che peptidi isolati dalla caseina sono in grado di legare specifici siti recettoriali sui fagociti di sangue umano ⁶. Una ricerca di Iskander et al. ha dimostrato inoltre come il possibile target recettoriale sia rappresentato dai Pattern Recognition Receptors (PRRs), quali i Toll-like Receptors (TLRs) ⁷. I PRRs sono proteine espresse prevalentemente dalle cellule del sistema immunitario innato, in grado di riconoscere specifici pattern molecolari quali i pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) e i damage-associated-molecular patterns (DAMPs). Il legame dei peptidi idrolisati a tali recettori può impedire l'interazione tra i TLRs e i fattori solubili pro-infiammatori. Inoltre, i peptidi possono direttamente attivare la cascata recettoriale legata a specifici TLRs con attività tollerogena.

Numerosi studi *in vitro* hanno chiarito che i peptidi idrolisati hanno la capacità di potenziare l'effetto barriera dell'epitelio intestinale, indurre uno stato tollerogenico nelle APCs, mantenere l'omeostasi tra le risposte Th1 e Th2 e regolare l'azione dei Treg. Ad oggi, un limitato numero di studi *in vivo* su animale ha confermato questi risultati (Tab. I).

L'effetto degli idrolisati sul potenziamento della barriera intestinale è stato indagato mediante studi *in vitro* e *in vivo* sul ratto. I principali meccanismi implicati si sono dimostrati la normalizzazione dell'espressione di mRNA di geni codificanti per le proteine costituenti le tight junctions tra le cellule epiteliali e l'aumentata produzione della citochina IL-10 con ruolo anti-infiammatorio ⁸. Inoltre, uno studio condotto da Nielsen et al. ha osservato che la caseina sottoposta ad idrolisi mediante l'uso combinato di due enzimi (pepsina e corolasi) ha un maggiore potere anti-infiammatorio (riduzione di numerosi marker d'infiammazione) sulla mucosa intestinale rispetto alla caseina trattata con la sola pepsina, dimostrando una maggiore efficacia del preparato maggiormente idrolizzato ⁹.

Oltre al miglioramento della funzione di barriera a livello intestinale, i peptidi idrolisati sono in grado di indurre uno stato tollerogenico nelle APCs. In particolare, uno studio *in vitro* ha dimostrato che alcuni peptidi riducono la produzione di molecole infiammatorie da parte dei macrofagi attivati, favorendo uno stato di tolleranza immunitaria e di riparazione tissutale ¹⁰.

Per quanto riguarda il mantenimento dell'equilibrio tra risposta Th1 e Th2 e la regolazione dell'azione dei Treg, gli effetti degli idrolisati sono dovuti prevalentemente all'induzione dell'espressione di geni codificanti per citochine di tipo Th1 (in particolare, IL-2 e IFN- γ) e all'aumentata produzione di IL-10 da parte dei Treg, con conseguente riduzione dello stato pro-infiammatorio a livello mucosale ¹¹.

Ad oggi, quindi, le evidenze circa gli effetti immunomodulanti degli idrolisati proteici sono state ottenute da studi *in vitro* o *in vivo* sull'animale. Inoltre, la grande varietà di idrolisati impiegati nei trials non permette di esprimere un giudizio univoco e definitivo sulle proprietà di questi preparati. È dunque necessario ormai poter

Tabella I. Principali funzioni immunomodulanti degli idrolisati proteici.

• Potenziamento dell'effetto barriera dell'epitelio intestinale
• Induzione di uno stato tollerogenico nelle APCs
• Mantenimento dell'omeostasi tra le risposte immunitaria Th1 e Th2
• Regolazione dell'azione dei Treg
• Riduzione dello stato pro-infiammatorio a livello mucosale

confermare anche nell'uomo i dati pubblicati su modelli animali. Nei futuri studi dovranno essere altresì descritte con massima precisione le caratteristiche dell'idrolisato utilizzato (l'origine, il grado di idrolisi e le tecniche di processazione del prodotto) e si dovrà valutare separatamente l'azione biologica degli specifici peptidi costituenti l'idrolisato. Quindi, benché gli attuali risultati siano promettenti, sono necessari nuovi studi per chiarire ulteriormente quali siano i meccanismi d'azione alla base delle proprietà immunomodulanti degli idrolisati proteici e per individuare possibili applicazioni terapeutiche di specifici peptidi idrolisati così da poter sfruttare la loro azione tollerogenica.

Bibliografia

- ¹ Sackesen C, Assa'ad A, Baena-Cagnani C, et al. Cow's milk allergy as a global challenge. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2011;11:243-8.
- ² Tanabe S. Analysis of food allergen structures and development of foods for allergic patients. *Biosci Biotechnol Biochem* 2008;72:649-59.
- ³ van Wijk F, Knippels L. Initiating mechanisms of food allergy: oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed Pharmacother* 2007;61:8-20.
- ⁴ Langrish C, Chen Y, Blumenschein W, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005;201:233-40.
- ⁵ Wichers H. Immunomodulation by food: promising concept for mitigating allergic disease? *Anal Bioanal Chem* 2009;395:37-45.
- ⁶ Jaziri M, Miglioiresamour D, Casabiancapignede M, et al. Specific binding-sites on human phagocytic blood-cells for gly-leu-phe and val-glu-pro-ile-pro-tyr, immunostimulating peptides from human-milk proteins. *Biochim Biophys Acta* 1992;1160:251-61.
- ⁷ Iskandar MM, Dautletbaev N, Kubow S, et al. Whey protein hydrolysates decrease IL-8 secretion in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated respiratory epithelial cells by affecting LPS binding to toll-like receptor 4. *Br J Nutr* 2013;110:58-68.
- ⁸ Visser JT, Lammers K, Hoogendijk A, et al. Restoration of impaired intestinal barrier function by the hydrolysed casein diet contributes to the prevention of type 1 diabetes in the diabetes-prone BioBreeding rat. *Diabetologia* 2010;53:2621-8.
- ⁹ Nielsen DSG, Theil PK, Larsen LB, et al. Effect of milk hydrolysates on inflammation markers and drug-induced transcriptional alterations in cell-based models. *J Anim Sci* 2012;90:403-5.
- ¹⁰ Oseguera-Toledo ME, Gonzalez dME, Dia VP, et al. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF-kappa B pathways. *Food Chem* 2011;127:1175-85.
- ¹¹ Cian RE, Lopez-Posadas R, Drago SR, et al. A porphyra columbina hydrolysate upregulates IL-10 production in rat macrophages and lymphocytes through an NF-kappa B, and p38 and JNK dependent mechanism. *Food Chem* 2012;134:1982-90.