

ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE PROTEÍNAS LÁCTEAS Y SUS HIDROLIZADOS

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF MILK PROTEINS AND THEIR HYDROLYSATES

WILMAN CARRILLO

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

Correspondencia: w.carrillo@csic.es

Resumen

Las proteínas alimentarias tienen un indudable valor nutricional. Son fuente de nitrógeno y de aminoácidos esenciales en el organismo. Además de su valor nutricional, existen cada vez más evidencias científicas que demuestran que las proteínas alimentarias y fragmentos derivados de las mismas pueden ejercer distintas actividades biológicas en el organismo. Se han descrito diferentes actividades biológicas de las proteínas de la leche como actividad antibacteriana, antiviral, antihipertensiva, antioxidante y antitumoral. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antiproliferativa frente a nueve líneas cancerígenas de proteínas lácteas, de sus hidrolizados y péptidos sintetizados químicamente. El hidrolizado de caseínas presentó actividad antiproliferativa frente a la línea celular (K-562) con un IG50 de 2,4 µg/mL y un efecto dosis dependiente.

Palabras clave: Actividad antiproliferativa, caseínas, hidrólisis enzimática y péptidos bioactivos.

English

Português

ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF MILK PROTEINS AND THEIR HYDROLYSATES

SUMMARY

Undoubtedly, dietary proteins have a high nutritional value. They are a source of nitrogen and essential amino acids for our body. In addition to their nutritional value, there is growing scientific evidence showing that dietary proteins and protein fragments may exert different biological activities in the organism. It has been reported different biological activities of milk proteins, including antibacterial, antiviral, antihypertensive, antioxidant, and antitumor properties. The objective of this study was to assess the antiproliferative activity of milk proteins, their hydrolysates and chemically-synthesized peptides against nine human cancer cell lines. Casein hydrolysates showed antiproliferative activity against a cell line (K-562) with a GI50 of 2.4 µg / mL and a dose-dependent effect.

Keywords: antiproliferative activity, caseins, enzymatic hydrolysis, bioactive peptides

ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE PROTEÍNAS LÁCTEAS E SEUS HIDROLISADOS

RESUMO

As proteínas alimentícias têm um inquestionável valor nutricional. São fonte de nitrogênio e de aminoácidos essenciais no organismo. Além do seu valor nutricional, existem cada vez mais evidências científicas que demonstram que as proteínas alimentícias e fragmentos derivados das mesmas podem exercer diferentes atividades biológicas no organismo. Foram descritas diferentes atividades biológicas das proteínas do leite como a atividade antibacteriana, antiviral, anti-hipertensiva, antioxidante e antitumoral. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa frente a nove linhas cancerígenas de proteínas lácteas, dos seus hidrolisados e peptídeos sintetizados quimicamente. O hidrolisado de caseínas apresentou atividade antiproliferativa frente à linha celular (K-562) com um IG50 de 2,4 µg/mL e um efeito dose dependente.

Palavras-chave: atividade antiproliferativa, caseínas, hidrólise enzimática, peptídeos bioativos

Introducción

Estudios epidemiológicos sugieren que los factores de la dieta juegan un papel importante en etiología de muchos tipos de cáncer. Los agentes quimiopreventivos son aquellos que ayudan a prevenir o retardar el desarrollo de cáncer (Gálvez et al., 2001). En las dos décadas pasadas la prevención del cáncer ha tomado mucha importancia. Por ejemplo, la prevención del cáncer de pulmón eliminando el hábito de fumar. Actualmente la quimiopreención a través de sustancias fitoquímicas comestibles está considerada un método asequible, fácilmente aplicable, aceptable y accesible para controlar y tratar el cáncer (Surh, 2003). Se sabe que muchos alimentos generan un efecto protector frente a la formación de tumores. Las proteínas alimentarias, en muchos casos, son las que juegan ese papel protector ya sea por sí solas o por fragmentos de sus secuencias que se forman durante la digestión gastrointestinal. Dichos fragmentos son inactivos dentro de la proteína paterna y solo son activos cuando se liberan por hidrólisis (Phelan y Col., 2009; Philanto y Korhonen, 2003). Diferentes estudios citoquímicos han demostrado que péptidos derivados de proteínas alimentarias modulan la proliferación, diferenciación y apoptosis de diferentes tipos celulares. Ciertos péptidos derivados de la leche producen apoptosis, especialmente en células malignas, mientras que las células normales se ven poco afectadas (Silva y Malcata, 2005). Estos efectos de modulación celular e inmunomoduladores derivados de péptidos de proteínas alimentarias contribuyen a brindar protección frente al desarrollo de tumores (Phelan y col., 2009). La leche es reconocida como una buena fuente de sustancias bioactivas. Las proteínas de la leche son consideradas como la fuente más importante de producción de péptidos bioactivos (Chobert, 2003). Se han descrito péptidos bioactivos de caseínas y proteínas de suero. El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad anti-proliferativa de proteínas lácteas, de sus hidrolizados y de péptidos identificados en los hidrolizados.

Materiales y métodos

Proteínas de origen lácteo: Caseínas bovinas, hidrolizado de caseínas bovinas α s2-caseína (α s2-CN) bovina e hidrolizado de proteínas de suero. Péptidos de origen lácteo: Se usaron péptidos procedentes de la κ -caseína bovina correspondientes a los fragmentos f(64-75) **PAAVRSPAQLQ** y f(139-146) **VESTVATL**. Se utilizó el péptido del fragmento f(183-207) **VYQHQAAMKP-WIQPKTKVPIYVRYL** de la α s2-CN bovina.

Obtención de la fracción caseínica y de la α s2-CN bovina

Obtención de caseínas

Las caseínas bovinas se obtuvieron según el método descrito por López-Expósito y col. (2007). Para separar la fracción caseínica, se disminuyó el pH a 4,6 con HCl 0,1 N de la leche cruda desnatada y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se centrifugó a $4.000 \times g$ y $5^{\circ}C$ durante 20 min. El precipitado de caseínas se lavó dos veces con agua acidulada a pH 4,6 con el objetivo de eliminar restos de proteínas séricas, centrifugándose ($40.000 \times g$, 15 min, $5^{\circ}C$) después de cada lavado. Posteriormente, se hicieron tres lavados con una mezcla de agua/diclorometano en una proporción 50:50, para eliminar restos de grasa residual en condiciones de centrifugación similares a las anteriores. Una vez hechos los lavados, el precipitado se congeló y liofilizó.

Obtención de α s2-caseína bovina

La α s2-CN bovina se preparó según el método de Vreeman y Van Riel, (1990), con algunas modificaciones. Se preparó una disolución de caseína liofilizada en agua milli-Q (Millipore) hasta alcanzar una concentración del 8% (p/v). Tras aumentar el pH a 7,0 con NaOH, se añadió dithiothreitol (DTT) en una proporción del 1,2% (p/p) para reducir los puentes disulfuro. Se agitó a $5^{\circ}C$ hasta conseguir la disolución completa de la caseína y se calentó a $80^{\circ}C$ con el fin de inactivar la plasmina. Tan pronto como alcanzó esa temperatura se interrumpió el calentamiento dejando que la disolución llegase por sí misma a $60^{\circ}C$ y, en ese momento, se introdujo en un baño de hielo hasta alcanzar $20^{\circ}C$. Se ajustó el pH a 6,5 con HCl ó NaOH 0,1 N y se añadió lentamente, agitando y en frío 1-propanol hasta alcanzar una concentración del 40% (v/v). La solución se dejó durante la noche en un baño de hielo dentro de una cámara fría a $2^{\circ}C$. Las partículas resultantes de la suspensión se recogieron por centrifugación a $17.000 \times g$ en una centrífuga modelo Avanti™ J-25 (Beckman Instruments Inc., Fullerton, USA), durante 30 min a $5^{\circ}C$. Para asegurar que la temperatura no excedía de los $5^{\circ}C$, el rotor junto con los tubos de centrífuga se pre-enfriaron a $5^{\circ}C$. El sobrenadante se decantó y drenó del precipitado, el cual se lavó con 1-propanol al 40% mediante una centrifugación en condiciones similares a las anteriores. Una vez lavado, el precipitado se congeló y liofilizó.

Hidrólisis de la caseína bovina

Para obtener los hidrolizados, se preparó una suspensión acuosa de caseína al 0,5% (p/v), se ajustó con HCl 1 M el pH a 2,0 y se añadió pepsina porcina A (E.C. 3.4.23.1., 570 U/mg de proteína) (Sigma) diluida para obtener una relación enzima/sustrato 3,7% (p/p). La hidrólisis se llevó a cabo durante 3 horas a $37^{\circ}C$. La inac-

tivación de la enzima se realizó mediante calentamiento a 80°C durante 20 minutos y ajustando con NaOH 1 M el pH a 7,0. Los hidrolizados se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 minutos a 5°C y se recogieron los sobrenadantes.

Síntesis de péptidos

Se sintetizaron los siguientes péptidos: los fragmentos de la κ -caseína bovina f(64-75) **PAAVRSPAQLQ** y f(139-146) **VESTVATL** de la κ -caseína bovina, y el fragmento f(183-207) **VYQHQAAMKPKWIKPKTKVIPYVRYL** correspondiente a la α 2-caseína bovina. Todos los péptidos ensayados fueron sintetizados químicamente en el laboratorio del Instituto de Fermentaciones Industriales (CSIC), mediante el método Fmoc en fase sólida con un sintetizador modelo 431 A de Applied Biosystems Inc. (Überlingen, Alemania). Los péptidos fueron analizados por RP-HPLC-ESI-MS/MS para comprobar su pureza y secuencia. Los péptidos se purificaron tras su síntesis mediante RP-HPLC a escala semipreparativa.

RP-HPLC a escala semipreparativa

Los péptidos sintéticos de la κ -caseína bovina se sometieron a RP-HPLC semipreparativo. Para ello se empleó un equipo Waters (Waters, Milford, USA) equipado con un sistema de doble bombeo modelo Delta 600, un detector de fotodiodos alineados modelo 996 y un inyector automático 717 plus, con una columna C18 Prep-Nova Pack HR (300 x 7,8 mm de diámetro interno, 4 μ m de tamaño de partícula) (Waters) y una precolumna C18 (Waters). La temperatura de la columna fue de 30°C y el flujo de 4 mL/min. El eluyente A consistió en 100% de agua milli Q[®] y 0,1% ácido trifluoroacético (TFA) y el eluyente B de 100% acetonitrilo y 0,08% TFA. La detección se llevó a cabo a 220 nm. Los péptidos se eluyeron con un gradiente de B en A del 0% al 40% B en 40 min, del 40% al 70% B en 5 min. La muestra se preparó a una concentración de 5 mg/mL y se centrifugó a 16.000 x g durante 10 min previamente a la inyección. Se inyectaron 500 μ L. Las fracciones obtenidas tras sucesivos análisis cromatográficos se liofilizaron y se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de fase B en A que iba del 0% al 40% B en 40 min y del 40% al 70% B en 5 min a un flujo de 4 mL/min. La concentración de las muestras fue de aproximadamente 5 mg/mL, y el volumen de inyección de 500 μ L. Las fracciones se recogieron tras 15-20 inyecciones de manera automática y tras ello se liofilizaron y se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Análisis por RP-HPLC-ESI-MS/MS (on line)

Los hidrolizados de caseínas y los péptidos una vez sintetizados y purificados se identificaron mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas con ionización

por electrospray (HPLC-ESI-MS/MS) on line. Para ello se utilizó un sistema HP Agilent 1100 System de Agilent Technologies (Waldbronn, Alemania) conectado on line a un Esquire-LC de Bruker Daltonik (Bremen, Alemania). El sistema de HPLC estaba equipado con una bomba cuaternaria, un detector de longitud de onda variable a 214 nm y un inyector automático, todos ellos Agilent Series 1100. Como sistema de adquisición de datos se utilizó el programa ChemStation (Agilent Technologies). Se empleó una columna en fase inversa C18 Hi-pore (250 x 4,6 mm de diámetro interno) (Bio-Rad, Richmond, USA). El volumen de inyección fue de 50 μ L y la concentración de la muestra de 4,5 mg/mL, disueltas en fase A. Como eluyente A se utilizó 100 % de agua + TFA al 0,037 % (v/v), y como eluyente B 100 % de acetonitrilo + TFA al 0,027 % (v/v). Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal del 0% al 70% B en 65 min a un flujo de 0,8 mL/min. El flujo se dividió tras el detector con un divisor de flujo consistente en una pieza T (Valco, Houston, USA) conectada a un tubo de salida con un diámetro interno de aproximadamente 75 μ m, y una longitud óptima para dar un flujo final aproximado de 20 μ L/min hacia el nebulizador del espectrómetro de masas. Como método de ionización se utilizó la técnica de ionización ESI y como analizador se utilizó una trampa de iones. El espectrómetro de masas utilizó N₂ para la nebulización, y los espectros de masas se adquirieron en el rango de 100-2.500 m/z. El voltaje del capilar fue de 4 kV. Para la realización del análisis por MS se tomaron como media 25 espectros, mientras que en el análisis por MS₂ se consideraron cinco espectros. El análisis de los diferentes compuestos por MS₂ se realizó en aquellos que presentaron una intensidad mayor de 10.000. Los iones precursores se aislaron en un intervalo de relación masa/carga de 4 unidades, y se fraccionaron empleando una rampa de voltaje entre 0,35 y 1,4 V. Como sistema de adquisición de datos se utilizó el programa Esquire Control, versión 5,0 (Bruker Daltoniks). Para identificar la secuencia de los diferentes péptidos se utilizaron los programas informáticos Data AnalysisTM 3,0 (Bruker Daltoniks) y Biotools 2,1 (Bruker Daltonik).

Evaluación de la actividad antiproliferativa en células tumorales humanas

Se evaluó la actividad antiproliferativa de proteínas de origen lácteo, sus respectivos hidrolizados y péptidos sintéticos frente a células tumorales humanas utilizando el ensayo de sulforrodamina B (SRB) para la evaluación del crecimiento celular (Monks y col., 1991). Se emplearon las nueve líneas celulares tumorales humanas: U251 (sistema nervioso central), UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-H460 (pulmón), OVCAR-3 (ovario), PC-3 (próstata), HT-29 (colon), 786-0 (renal), K562 (leucemia), NCI-ADR/RES (ovario con resistencia a múltiples drogas). Para los ensayos de citotoxicidad en célu-

las sanas se utilizó la línea celular VERO (célula epitelial de macaco verde africano).

Estas líneas cedidas por el *National Cancer Institute* de Estados Unidos de América (NCI-EUA), se conservaron en el laboratorio de cultivo de células en frascos de 25 cm³ (Nunc[®]) con 5 mL de medio RPMI1640 (Gibco[®]) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco[®]) e incubadas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂. 100 µL de las células se inocularon en placas de 96 pocillos (Nunc[®]) con una densidad de inoculación entre 3x10⁴ y 6,5x10⁴ cel/mL en medio RPMI/SFB suplementado con 50 µL de gentamicina (Schering plus[®]). Luego se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C en atmosfera húmeda con 5% de CO₂ seguidamente se agregaron 100 µL/pocillo con las muestras a ensayar en cuatro concentraciones distintas (0,25; 2,5; 25 y 250 µg/mL).

Para la preparación de las muestras, una alícuota de 10 mg de cada muestra se disolvió en 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, 50 µL de las soluciones se disolvieron en 950 µL de medio de RPMI/5% SFB, para la preparación de las muestras de trabajo. Las muestras se diluyeron sucesivamente, en medio de cultivo, para obtener las concentraciones finales de 0,25; 2,5; 25 y 250 µg/mL. La concentración final de DMSO no interfiere en el crecimiento celular.

Para la preparación de las muestras, una alícuota de 10 mg de cada muestra se disolvió en 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Luego, 50 µL de las soluciones se disolvieron en 950 µL de medio de RPMI/5% SFB, para la preparación de las muestras de trabajo. Las muestras se diluyeron sucesivamente, en medio de cultivo, para obtener las concentraciones finales de 0,25; 2,5; 25 y 250 µg/mL. La concentración final de DMSO no interfiere en el crecimiento celular. Para el control positivo se utilizó el quimioterapéutico Doxorubicina, en las mismas concentraciones de las muestras. En este momento, se procedió a la fijación de las células con ácido tricloacético (TCA) al 50% de la placa control llamada T0, que permitió determinar la cantidad de células en el momento de la adición de las muestras. Se incubaron las placas durante 48 horas, pasado este tiempo las células se fijaron con 50 µL /pocillo con TCA al 50% y se incubaron 1 hora a 4°C, seguidamente las placas se lavaron cuatro veces con agua destilada para remover los residuos de TCA, medio, SFB y metabolitos secundarios. Las placas se secaron completamente a temperatura ambiente, una vez secas se colorearon con 50 µL /pocillo de SRB 0,4% (p/v), disuelto en ácido acético al 1%, se incubaron durante 1 hora a 4°C, seguidamente se lavaron, cuatro veces con ácido acético al 1% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Finalmente las proteínas celulares ligadas al colorante se solubilizaron con una solución de Trizma Base (Sigma[®]) 10 µM a pH 10,5. La lectura espectrofotométrica de la absorban-

cia se realizó a 540 nm en el lector de microplacas.

Se generaron gráficos de porcentaje de crecimiento en función de la concentración de las muestras ensayadas, para cada una de las líneas celulares ensayadas. Se tuvieron en cuenta tres concentraciones efectivas denominadas GI50 (concentración necesaria para inhibir el 50% del crecimiento celular), se calculó por regresión no lineal, tipo sigmoidal, utilizándose el software Origin[®], versión 7,5. Para los ensayos de citotoxicidad se utilizó una línea celular normal VERO (célula epitelial de riñón de mono verde africano) se utilizó el ensayo de sulforrodamina B (SBR) para la evaluación del crecimiento celular (Monks y col., 1991). El procedimiento fue igual al descrito para las células tumorales.

Resultados y discusión

Proteínas de origen lácteo y sus hidrolizados Caseínas

En los ensayos se utilizó la doxorubicina (fármaco anticancerígeno) como control positivo. Este presentó actividad citoestática y citocida frente a todas líneas celulares (**Figura 1**). Se evaluó la actividad de proteínas de origen lácteo, y diferentes hidrolizados de las mismas a escala de laboratorio y escala industrial (denominados comerciales) y de distintos péptidos de origen lácteo. En la **Figura 2A** se muestra el efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la línea tumoral leucémica (K-562) que presentaron las caseínas bovinas totales sin hidrolizar. Dicho efecto citoestático logró reducir el 50% de las células de este linaje con una concentración de 25 µg/mL, además esta actividad fue claramente dosis dependiente. Por otro lado el hidrolizado de caseínas bovinas (laboratorio) producto de la hidrólisis con pepsina mostró un efecto inhibitorio mayor de esta misma línea celular de leucemia (K-562) logrando reducir el 50% del crecimiento celular a una concentración de 2,4 µg/mL, en este caso también la actividad se observó un efecto dosis-dependiente (**Figura 2B**). Este dato es destacable teniendo en cuenta que en la bibliografía se describe, por ejemplo, que un hidrolizado de lactoferrina inhibió el 50% de la línea tumoral de leucemia (H-L60) a una concentración de 500 µg/mL (Roy y col., 2002). En este estudio se evaluó la actividad antiproliferativa de un hidrolizado de caseínas bovinas (comercial) y un hidrolizado de proteínas de suero. En la **Figura 3** se muestra la actividad de los hidrolizados. El hidrolizado de caseínas comercial mostró cierta actividad citoestática sobre la línea tumoral de leucemia (K-562) pero no alcanzó a reducir el 50% de las células. El hidrolizado de proteínas de suero logró reducir el 50% del crecimiento de la línea tumoral de leucemia (K-562). Dicha actividad ocurrió a la máxima concentración (250 µg/mL).

En trabajos anteriores del grupo se identificaron secuencias de péptidos procedentes de la κ-caseína

con actividad antibacteriana. Dentro de esos péptidos se describieron dos secuencias que fueron bactericidas para *Escherichia coli* y muy activos frente a los Gram-positivos ensayados, estos péptidos fueron el fragmento f(64-75) PAAVRSPAQLIQ fragmento f(139-146) VESTVATL de la κ -caseína bovina (López-Expósito y col., 2006c). Se sabe que la actividad antibacteriana de los péptidos puede deberse a muchas razones, como su carga, la hidrofobia y otras características (Yeaman, M y Yount, M, 2003). Se decidió evaluar la actividad de estos dos péptidos El péptido correspondiente al fragmento f(64-75) PAAVRSPAQLIQ de la variante A de la κ -caseína bovina sólo logró inhibir el 50% del crecimiento celular de la línea leucémica (K-562) a la máxima concentración ensayada 250 μ g/mL. Por otro lado, el péptido f(139-146) VESTVATL de la variante A de la κ -caseína bovina logró reducir el 50% del crecimiento de la línea tumoral de leucemia (K-562) a la concentración más baja ensayada (0,25 μ g/mL) y este efecto citoestático fue dosis dependiente. Es importante resaltar que el péptido VESTVATL tiene especificidad sobre una línea tumoral específica. (Figura 4).

Por otro lado, también se decidió evaluar la actividad antitumoral de otro péptido de origen lácteo con actividad antibacteriana descrito por el grupo: el fragmento f(183-207) VYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL de la α s2 bovina (Recio y Visser, 1999b). Este péptido logró reducir el 50% del crecimiento celular de la línea tumoral de leucemia (K-562), siendo el efecto dosis-dependiente. La proteína precursora, α s2 caseína bovina, tuvo efecto citoestático frente a la misma línea de leucemia (K-562) pero sin llegar a reducir el 50% del cre-

cimiento celular (Figura 5). Estos datos son coherentes con los obtenidos de la actividad antiproliferativa de las caseínas totales descritos anteriormente, donde las caseínas totales lograron reducir el 50% del crecimiento de la misma línea tumoral de leucemia (K-562) (Figura 5). Teniendo en cuenta lo anterior, sugerimos que parte la actividad antitumoral presentada por las caseínas totales podría deberse a la presencia de la α s2 caseína bovina. Mientras que la actividad presentada por el hidrolizado de las caseínas bovinas en parte podría deberse a la presencia del fragmento f(183-207). Mediante análisis de espectrometría de masas se verificó la presencia del péptido f(183-207) VYQHQKAMKPWIQPKTKVIPYVRYL de la α s2 CN bovina

FIGURA 1
Gráfica de la actividad antitumoral de Doxorubicina (control positivo) a diferentes concentraciones tras 48 horas de incubación.

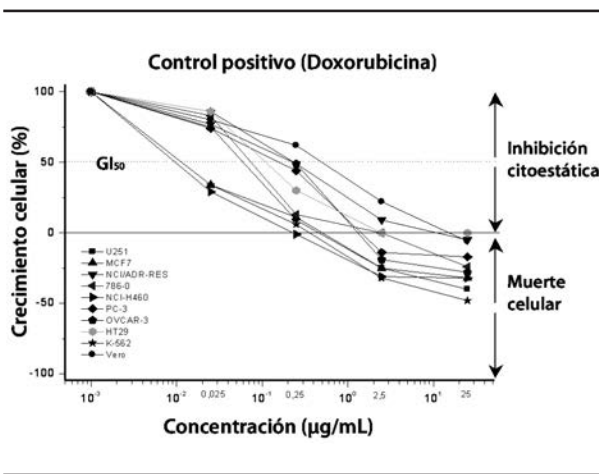


FIGURA 2
Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de proteínas lácteas: (A) Caseínas bovinas totales (B) Hidrolizado de caseínas bovinas.

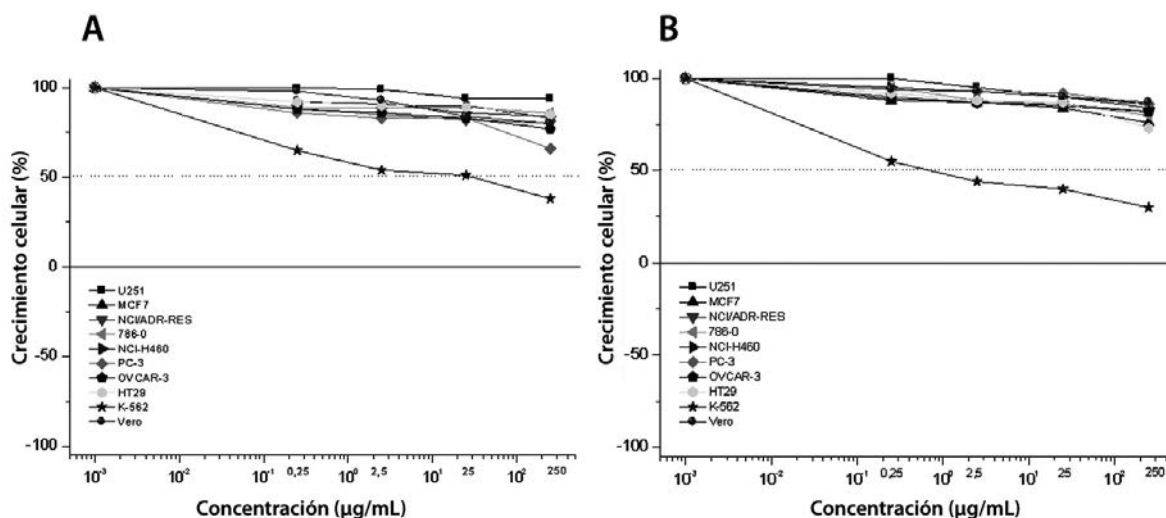


FIGURA 3

Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de hidrolizado de proteínas de suero.

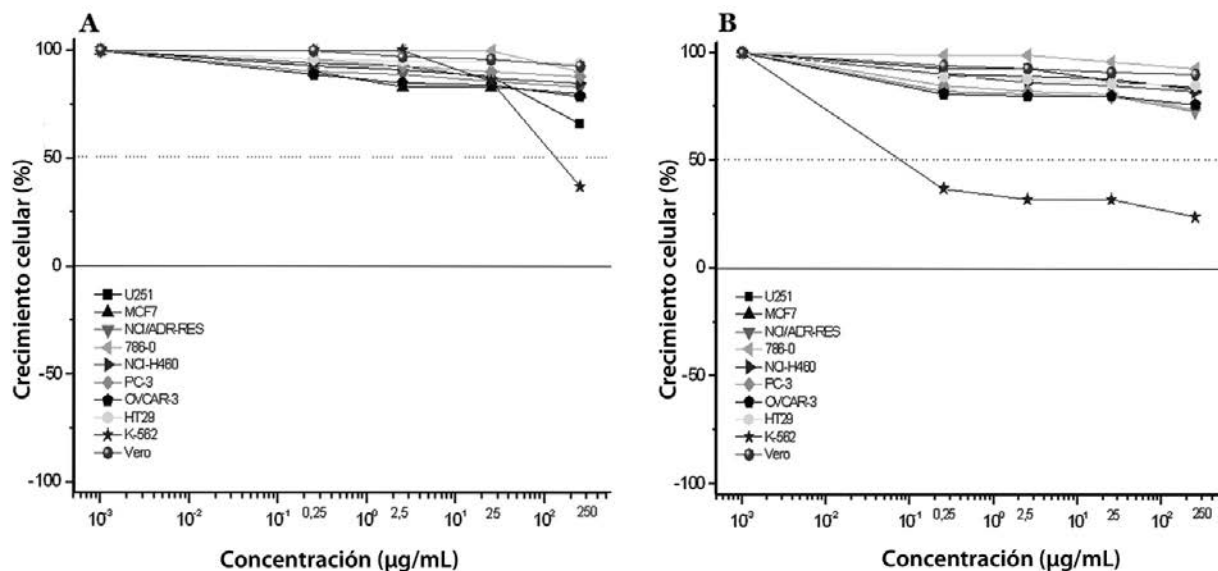


FIGURA 4

Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de péptidos de la κ-caseína bovina: (A) f(64-75) PAAVRSPAQILQ (B) f(139-146) VESTVATL

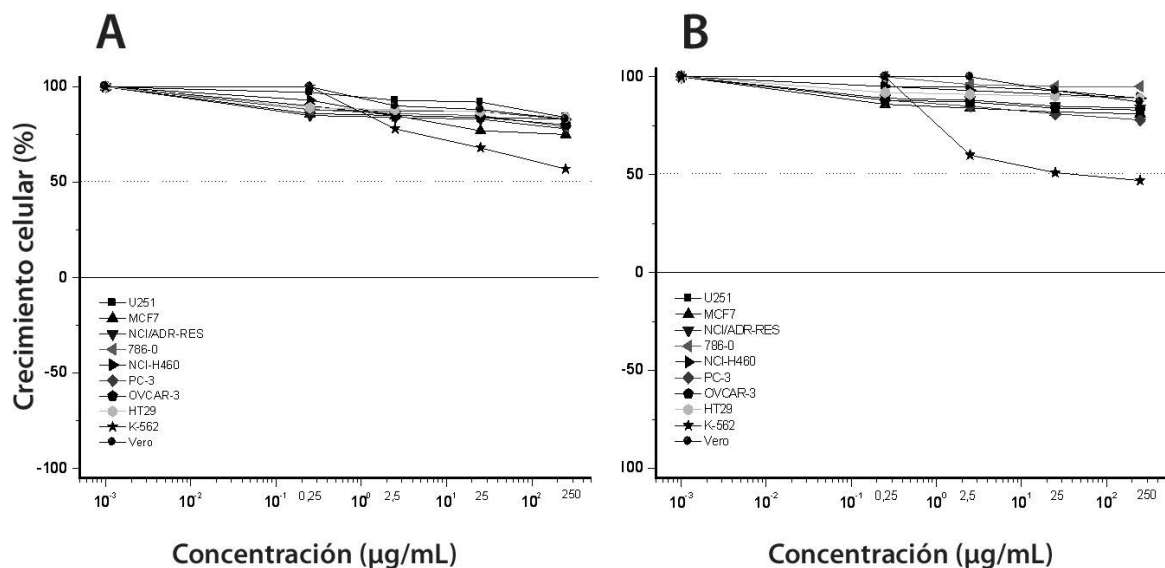


FIGURA 5

Porcentaje de crecimiento celular después de 48 horas de incubación con diferentes concentraciones de: (A) α -S2 CN bovina (B) f(183-207) α -S2 CN bovina.

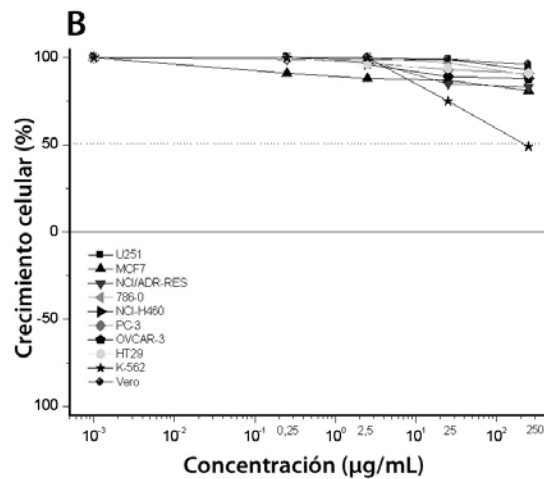
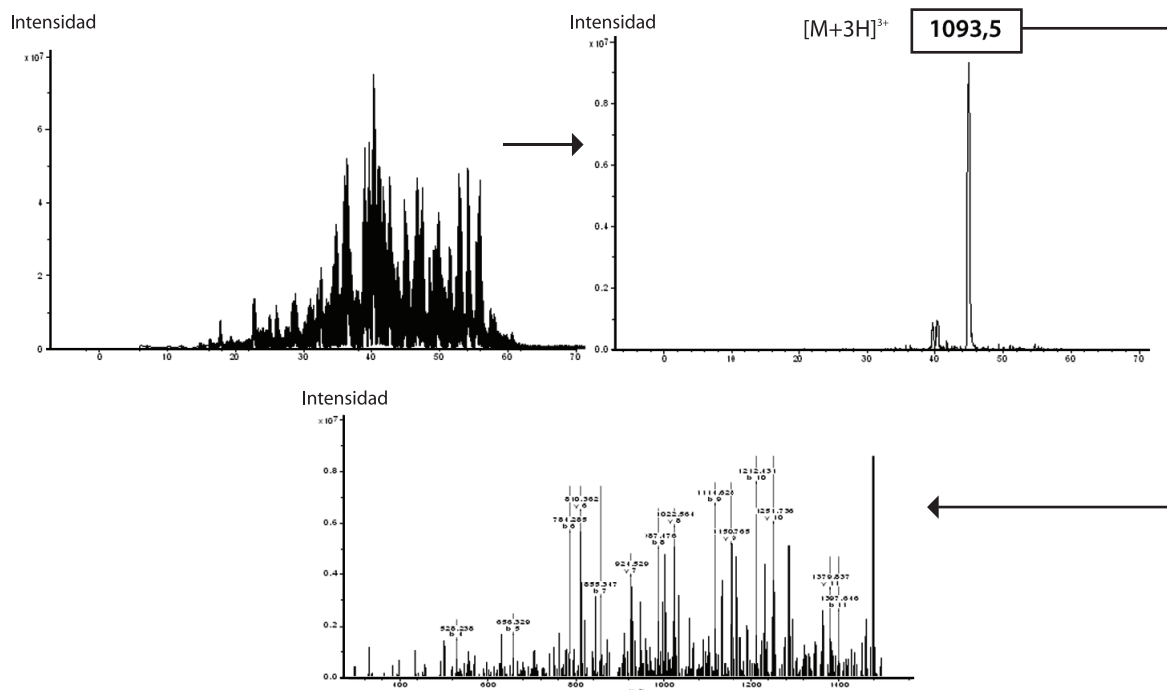


FIGURA 6

(A) Corriente total de iones (B) Extracción del ión molecular correspondiente al péptido f(183-207) VYQHQAAMKPWIQPKTKVIPYVRYL con m/z 1039,4 y (C) Espectro de MS/MS del ión m/z 1093,5.



Conclusiones

Las proteínas de leche tanto caseínas como proteínas de suero son usadas en la industria alimentaria para la elaboración de ingredientes funcionales por sus demostradas actividades biológicas en humanos. Las caseínas de la leche, sus hidrolizados y los péptidos sintéticos han demostrado actividad antiproliferativa frente a la

línea celular de leucemia K562. Especialmente el hidrolizado de caseína exhibió un IG50 de 2.4 $\mu\text{g/mL}$ y un efecto dosis respuesta. Sugiriendo con ello su posible uso como agentes anticancerígenos naturales. Siendo importante descifrar el mecanismo de acción de dichas moléculas biológicas.

Agradecimientos

Wilman Carrillo agradece a la Comunidad de Madrid por el contrato pre-doctoral de Personal de Apoyo de Investigación. También agradezco al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y a la Universidad Autónoma de Madrid y al Farmacéutico José Cayetano López Goñi por la correcciones".

Referencias bibliográficas

Chobert, J.A. Milk protein modification to improve functional and biological properties. *Advances in Food and Nutrition Research* Vol 47 q ISSN: 1043-4526 DOI: 10.1016/S1043-4526(03)47001-0.

Galvez, A., Chen, Na., Macasieb, J and de Lumen, B. Chemopreventive Property of a Soybean Peptide (Lunasin) That Binds to Deacetylated Histones and Inhibits Acetylation. *Cancer Research*. 61, 7473-7478, October 15, 2001.

López-Expósito, I., Minervini, F., Amigo, L. and Recio, I. (2006c). Identification of antibacterial peptides from bovine κ -casein. *J. Food Protection*. 69: 2992-2997.

López-Expósito, I., Quirós, A., Amigo, L. and Recio, I: Casein hydrolysates as source of antimicrobial, antioxidant and antihypertensive peptides. *Le Lait*. 2007, 87: 241-249.

Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Vaigro-Wolff A., Gray-Goodrich M., Campbell H., Mayo J., Boyd M: Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991,83: 757-766.

Phelan, M., Aherne, A., FitzGerlad, R.J and O'Brien, N.M: Casein-derived bioactive peptides: Biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. *Inter. Dairy Journal*. 2009, 19: 643-654.

Pihlanto, A and Korhonen, H. Bioactives peptides and Proteins. *Advances in food and nutrition research* 2003. VOL 47 q ISBN: 0-12-016447-7 DOI: 10.1016/S1043-4526(03)47004-6.

Recio, I and Visser Servaas: Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine α s2-casein. *Biochim. Biophys.* 1999, 1428: 314-326.

Silva, S and Malcata, X. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Journal* 15 (2005) 1-15. Review.

Surh, Y.J: Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Reviews*. 2003, 3: 768-780.

Vreeman, H.J., Van Riel, J.A.M: The large-scale isolation of α s2-casein from bovine casein. *Neth. Milk Dairy J*. 1990, 44, 43-48.

Yeaman, M. R and Yount, N: Mechanisms of Antimicrobial Peptide Action and esistence. *Pharmacological Reviews*. 2003, 55: 27-55.