

Estrés Oxidativo en Cáncer, SIDA, & Enfermedades Neurodegenerativas

e d i t e d b y

LUC MONTAGNIER

*Centre National de la Recherche Scientifique
Institut Pasteur
Paris, France*

RENE OLIVIER

*Institut Pasteur
Paris, France*

CATHERINE PASQUIER

*Centre National de la Recherche Scientifique
Faculté Xavier-Bichat
INSERM U294
Paris, France*



MARCEL DEKKER, INC.

NEW YORK • BASEL • HONG KONG

42. MODULACIÓN NUTRACEUTICA DEL GLUTATION CON UN AISLADO DE PROTEINA DE SUERO DE LECHE

HUMANIZADA NATIVA, IMMUNOCAL™ Y SU APLICACIÓN EN CANCER Y SIDA

Sylvain Baruchel and Ginette Viau

Universidad de McGill—Montreal Children's Hospital Research Institute, Montreal, Quebec, Canada

Rene Olivier

Instituto Pasteur en Paris, Francia

Gustavo Bounous

Hospital General de Montreal, Montreal, Quebec, Canada

Mark A. Wainberg

Hospital General Judío, Lady Davis Institute, Montreal, Quebec, Canada

INMUNOMODULACIÓN NUTRICIONAL Y SU RELACIÓN CON LA SÍNTESIS DEL GLUTATIÓN

La leche fresca, cruda incluye el grupo de proteínas que permanecen solubles en el "suero de la leche". Estas proteínas pueden ser conservadas en su forma nativa si se extrae cuidadosamente de su fuente natural.

En 1981 se descubrió que los ratones normales que fueron alimentados con un concentrado de proteína de suero de leche (especialmente preparado bajo condiciones no desnaturalizantes) exhibió un marcado incremento en la respuesta inmune humoral a un antígeno dependiente de linfocitos T helper (1). En los años siguientes, numerosos experimentos confirmaron la consistencia de este fenómeno (2-10). Durante un período de 12 años y en base a estos resultados un aislado humanizado nativo de proteína de suero de leche (HNMPI) llamado IMMUNOCAL™ se desarrolló en (Immunotec Research Corporation Ltd., Montreal, Quebec, Canadá).

Esta propiedad se encontró que estar relacionado, al menos en parte, a una mayor producción de glutatión esplénico (L-glutamylcysteinylglycine) (GSH) durante la expansión clonal del antígeno impulsado que requiere de oxígeno de la piscina de linfocitos en los animales alimentados con este bioactivo HNMPI (9). Los niveles adecuados de GSH son necesarios para la proliferación de linfocitos en el desarrollo de la respuesta inmune (11,12). Elevación moderada pero sostenida de GSH celular también se encontró en el hígado y el corazón de ratones saludables y viejos alimentados con esta HNMPI durante un período prolongado. Además, HNMPI aumentó notablemente su esperanza de vida en comparación con los animales controlados y alimentados nutricionalmente con dietas equivalentes (13).

El glutatión es de gran importancia en la actividad antioxidante celular en lo que Meister llama "el sistema GSH antioxidante" porque participa directamente en la destrucción de compuestos de oxígeno reactivos y también porque mantiene en forma reducida de ascorbato (vitamina C) y a-tocoferol (vitamina E), que también ejerce un efecto antioxidante (14).

FUNCIÓN DE HNMPI COMO SISTEMA DE ENTREGA DE CISTEÍNA

¿Qué ingrediente en IMMUNOCAL™ hace que sea un "sistema de entrega de cisteína" eficaz?

Disponibilidad sistémica de GSH oral es insignificante en el hombre (15) y no hay evidencia para el transporte de GSH en las células (16). Por lo tanto, tiene que ser sintetizado intracelularmente. Esto se produce en dos pasos: (a) la síntesis de glutamylcisteína; (b) la síntesis de glutatión. A pesar de que la afluencia de cisteína, glutamato y la glicina podría resultar algo limitante en circunstancias seleccionadas, numerosas observaciones han demostrado que es el transporte de cisteína (o cistina, que por lo general se reduce rápidamente a la cisteína en la entrada a la célula), que tiende a ser el tasa de limitación de evento en la síntesis de GSH, mientras que cisteína libre no representa un sistema de entrega de ideal (17), ya que es tóxico y se oxida espontáneamente.

La cisteína presente como el disulfuro de cistina liberada durante la digestión en el tracto gastrointestinal es más estable que el aminoácido libre. La síntesis de GSH se somete a inhibición por retroalimentación negativa del producto final GSH. El enlace disulfuro es pepsina y tripsina-resistente, pero se puede dividir por el calor y el estrés mecánico (9). La cistina representa

aproximadamente el 90% de la masa molecular baja de la cisteína en el plasma sanguíneo, mientras que la cisteína reducida se presenta solamente en una muy baja concentración (18).

En un estudio comparativo, se encontró que el suero de la leche comercial concentra y exhibe mucho menos bioactividad, incluyendo una menor promoción de actividad del GSH, contienen aproximadamente la mitad de la cantidad de albúmina sérica (9) y 4 veces menos lactoferrina que la HNMPi, expresado como porcentaje del total de proteínas de suero de leche. Immunocal es producido en un proceso patentado permisible que resulta en la preservación de las proteínas más termolábiles en su conformación nativa.

En la albúmina de suero, hay 17 residuos de cistina por 66 kDa molécula y 6 dipéptidos Glu Cys (19); en lactoferrina hay 17 por 77 kDa molécula y 4 dipéptidos Glu-Cys (20); y en el α -lactoalbúmina hay 4 cistinas en una molécula de 14.000 kDa

- **kDa significa kilodaltons (peso molecular)**

Table 1.

	Molecular Mass (kDa)	Residues	Cysteine residues per molecule	Cysteine (Cys) ₂ (disulfide)	Glu-(Cys) ₂
β -Lactoglobulin	18,400	162	5	2	0
α -Lactalbumin	14,200	125	8	4	0
Serum albumin	66,000	582	35	17	6
Lactoferrin	77,000	708	40	17	4

Source: Refs. 19, 20.

MODULACIÓN NUTRACÉUTICA DE GLUTATIÓN

(19). Por otro lado, beta lactoglobulina tiene sólo 2 cistinas en una molécula de 18,400 kDa (19), y IgG1, la inmunoglobulina predominante en suero de leche de vaca, tiene sólo 4 puentes de disulfuro en una molécula de 166.000 kDa (Tabla 1). Además, Meister y sus colaboradores (16) han demostrado que los precursores de la γ -glutamilcisteína (Glu-Cys) de GSH pueden entrar fácilmente en la célula y ser sintetizado en GSH. Por lo tanto, es notable destacar que las proteínas de la leche más lábiles -- albúmina de suero y lactoferrina-- son aquellos que contienen estos componentes peptídicos promoviendo el GSH putativo

Por último, la biodisponibilidad de este presunto componente activo (cistina y grupo Glu-Cys) puede estar influenciada por la coexistencia de las otras proteínas durante todo el proceso digestivo-absorción.

Esta propiedad recientemente descubierta de HNMPi resultó ser independiente de su valor nutricional, como otras proteínas de eficiencia nutricional similar, no presentan esta propiedad única (1-10). El concepto de que puede existir una actividad biológica específica, además de un efecto sistémico independiente de Immunocal como una buena fuente de proteínas se fundamenta en recientes ensayos in vitro (21).

La provisión dietética de cistina es particularmente relevante para el sistema inmunológico. La respuesta coordinada de los macrófagos y linfocitos en la respuesta inmune mediada por células T se regula, en parte, por la absorción de cisteína macrófagos y posterior liberación de la cisteína reducida en el entorno local para su absorción por los linfocitos. Cuando los macrófagos que presentan antígenos entran en estrecho contacto con las células T específicas de antígeno, ellas suministran estas células con cantidades adicionales de cisteína y con ello elevar su nivel de GSH intracelular (18).

La validez de esta hipótesis se confirma por la demostración de que el "immunoenhancing" y las promotoras GSH (datos no mostrados) efecto de IMMUNOCALTM es abolida por sulfoximina butionina, que inhibe la sintetasa γ -glutamilcisteína, el primer paso en la síntesis de GSH (17).

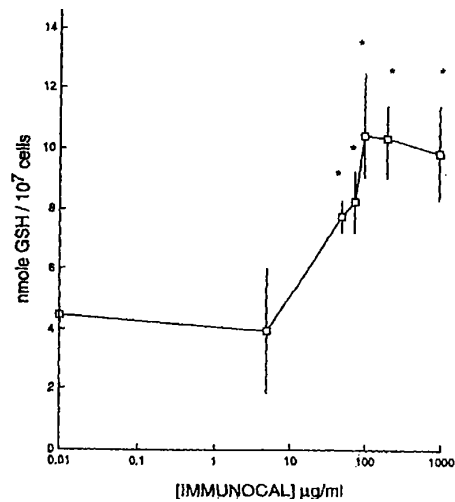


Figura 1. La incubación de PBMC durante 72 h en presencia de diversas cantidades de IMMUNOCAL™. Cada punto representa la media ± desviación estándar (SD) de 3 mediciones de glutatión intracelular. * p < 0.01

450 Baruchel et al.

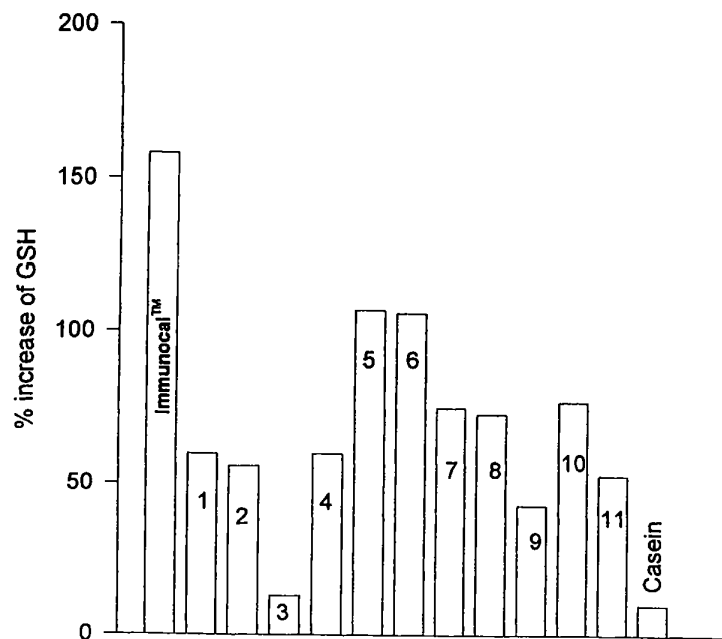


Figura 2. La incubación de PBMC durante 72 h en presencia de IMMUNOCAL™ y otros sueros de productos lácteos: Aumento porcentual de glutatión.

MODULACIÓN IN VITRO DE GLUTATIÓN INTRACELULAR POR IMMUNOCAL™

Hemos demostrado que los linfocitos humanos normales cultivados durante 3 días con HNMP1 10014 / ml muestran un aumento en el contenido de GSH intracelular de 4.5 ± 0.4 a 10.5 ± 3.4 nmol / 10⁶ células, $p < 0.01$ (Figura 1). Este aumento de GSH se correlaciona con un aumento en la proliferación celular medida por la incorporación de timidina (datos no mostrados). El aumento de GSH es dosis-dependiente y no se ha encontrado para la caseína o para cualquier concentrado de proteína de suero de leche disponible comercialmente (Figura 2).

Tabla 2 Presencia de efectos citopáticos en células MT-4

IMMUNOCAL™ (µg/ml)	TCID ₅₀ /well ^a			
	2000	200	20	2
0	+++	++	+	-
1	+++	++	+	-
10	++	+	+	-
100	-	-	-	-
500	-	-	-	-
1000	-	-	-	-

+ Presencia de efectos citopáticos; ausencia de efectos citopáticos.

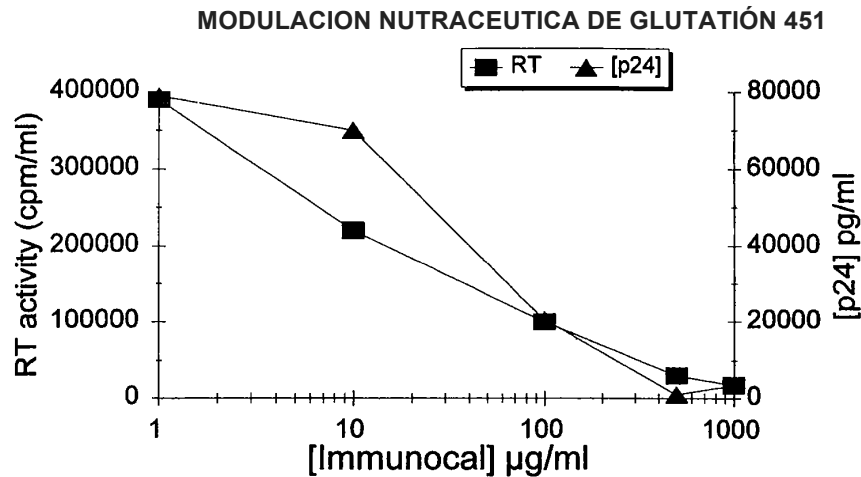


Figura 3. IMMUNOCAL™ se ha demostrado que inhiben la replicación del VIH

EN LA LUCHA CONTRA EL VIH IN VITRO Y LA ACTIVIDAD ANTIAPOPTÓTICA DE HNMP1

Clínicamente, no hay evidencia directa de que la infección por VIH se asocia con una deficiencia de GSH en las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) (18). El agotamiento de GSH intracelular sugiere una asociación entre el estrés oxidativo y la infección por VIH. El estrés oxidativo puede ser uno de los mecanismos que contribuyen a la progresión de la enfermedad y el síndrome de desgaste a través de mediadores de la inflamación, tales como TNF-ct y 1L-6. Durante este período de progresión, el glutatión se consume debido a un aumento del estrés oxidativo. El agotamiento de GSH, una consecuencia del estrés oxidativo crónico, es parte del espectro de la infección por VIH. GSH tiene, además, un papel crucial en función de los linfocitos y la supervivencia celular.

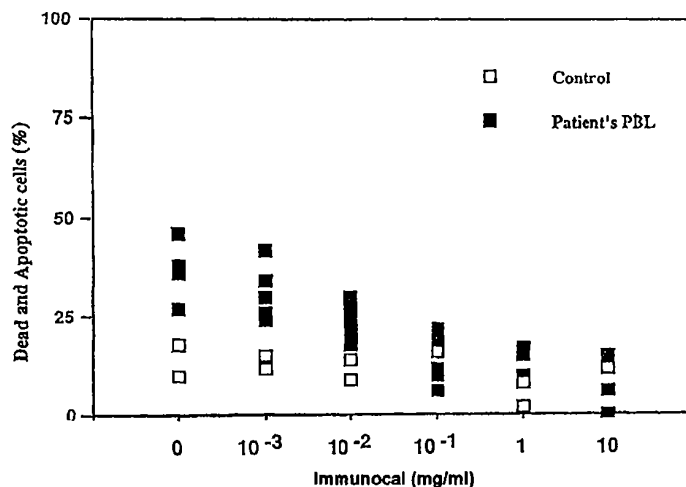


Figura 4. La inhibición de la muerte celular temprana por IMMUNOCAL™

IMMUNOCAL™ funciona como un sistema de entrega de cisteína que puede mejorar la síntesis in vitro del GSH (Figura 1) e inhibe la replicación del VIH en una célula mononuclear espinal, sistema infectado por HTL V-III B (Figura 3). I IMMUNOCAL™ también inhibe la formación del sincitio entre células infectadas y no infectadas. La inhibición de la formación del sincitio ocurrió en la misma concentración como la inhibición de la replicación del VIH (Tabla 2). Esta inhibición viral no se asoció con ninguna citotoxicidad. IMMUNOCAL™, a través de su actividad de promoción de GSH, reduce la apoptosis en las células infectadas por el VIH. La apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo en PBMC de individuos infectados por el VIH (Dr. R. Olivier, del Departamento de SIDA Retrovirus, Instituto Pasteur). PBMC infectadas por el VIH cultivadas en concentraciones de IMMUNOCAL™ de 100 Rg / m1 o superior eran menos propensas a morir de la apoptosis que las células no tratadas: $15\% \pm 2,6\%$ frente a $37\% \pm 2,4$, $p < 0,001$ (Figura 4).

--células mono nucleares de sangre periférica ((**peripheral blood mononuclear cell** PBMC es cualquier célula de sangre que tiene un núcleo redondo (en oposición a un núcleo lobulado).

SUPLEMENTACIÓN DE HNMPI EN EL SIDA Y EL SÍNDROME DE DESGASTE

Basados en estos datos preclínicos, se realizó un ensayo clínico canadiense (Canadian HIV Trials Network) con IMMUNOCAL™ en niños con SIDA y el síndrome de desgaste. El objetivo principal fue evaluar el efecto de la suplementación oral con IMMUNOCAL™ en parámetros nutricionales y la concentración de GSH intracelular de linfocitos de sangre en niños con SIDA y el síndrome de desgaste. Este fue un estudio piloto de un solo brazo abierto de 6 meses de duración. El síndrome de desgaste y la pérdida de peso severa en los 6 meses anteriores a la entrada del estudio fue un criterio absoluto para la entrada.

IMMUNOCAL™ se administró dos veces al día como un polvo diluido en agua. En algunos pacientes, IMMUNOCAL™ se administró por sonda nasogástrica cuando fue necesario. La dosis inicial administrada se basa en el 20% del requerimiento total de proteína al día y se incrementó en un 5% cada mes durante 4 meses para alcanzar 35% de la ingesta total de proteínas en el final del estudio. La duración total del estudio fue de 6 meses.

Circunferencias musculares peso, talla, pliegues cutáneos del tríceps y músculos de la mitad de los brazos, los recuentos de CD4 / CD8, y las concentraciones de GSH en linfocitos periféricos (medido por el ensayo espectrofotométrico) se midieron mensualmente. La ingesta de energía se evaluó mediante el uso de dos registros independientes de alimentos 2-días con un periodo de 2-3 semanas entre los registros de alimentos. Cada registro de alimentos incluyó un día de la semana y un fin de semana, y la media de estos registros se calculó para reflejar la ingesta nutricional diaria. De 14 pacientes incluidos, 10 fueron evaluables. Las edades de los pacientes eran de 8 meses a 15 años. Los 10 pacientes estudiados se inscribieron en cuatro centros diferentes a través de Canadá: Hospital de Niños de Montreal (Dr. S. Baruchel), el Hospital para Niños Enfermos de Toronto (Dr. S. King), el Hospital Infantil de Ontario Este (Dr. U. Allen) y Centro Hospitalario Laval de Quebec (Dr. F. Boucher). De los 4 pacientes restantes, 2 carecían de cumplimiento después de 2 meses, mientras que los otros 2 fallecieron por progresión de la enfermedad del SIDA dentro de los primeros 2 meses de la entrada en el estudio. Ninguna de las muertes se relacionó con el producto probado.

Ninguno de los pacientes experimentó ninguna toxicidad importante, como diarrea o vómitos o manifestación de intolerancia a la leche. Un paciente tuvo que parar IMMUNOCAL™ transitoriamente para la intolerancia digestiva menor, como náuseas y vómitos (<dos veces / día) a los 3 meses y, posteriormente, fue capaz de reiniciar el tratamiento sin ningún problema.

Al final del estudio, todos los pacientes experimentaron un aumento de peso en el intervalo de 3.2% a 22% de su peso inicial. El aumento de peso promedio para el grupo fue de $8.4\% \pm 5.7\%$. En el análisis de la media del porcentaje del requerimiento de ingesta de nutrientes (RNI) por mes para todos

En el análisis de la media del porcentaje de ingesta del requerimiento de nutrientes (RNI) por mes para todos los pacientes, no se encontró correlación entre el aumento de peso y un aumento significativo en el porcentaje medio de RNI, lo que sugiere la reducción del catabolismo en lugar de un efecto anabólico de IMMUNOCAL™. Seis de cada diez pacientes han demostrado una mejora en sus parámetros antropométricos como el pliegue tricéptico o la circunferencia muscular media del brazo independiente de un aumento en la ingesta de energía (Tabla 3),

Tabla 3. Los cambios de línea de base (expresados en porcentaje) en las semanas 24 y 36 en peso, medidas antropométricas y GSH en pacientes tratados con IMMUNOCAL™

Patient no.	Weight change (%)		Mid-arm muscle circumference change		Triceps skinfold change (%)		PBMC GSH change (%)	
	wk 24	wk 32	wk 24	wk 32	wk 24	wk 32	wk 24	wk 32
1	22.1	29.8	9.5	14.3	50.0	25.0	12.2	-9.0
2	14.0	17.3	18.7	25.3	20.0	-20.0	84.0	56.0
3	5.1	9.2	-3.0	-2.0	-17.0	-3.0	37.0	55.0
4	3.8	3.4	4.2	NA	-42.0	NA	305.0	550.0
5	7.1	4.5	13.1	11.4	-24.0	-16.0	-18.0	14.3
6	3.7	5.6	-2.0	-2.0	16.0	16.0	7.1	174.0
7	2.5	NA	5.0	NA	-13.0	NA	54.2	NA
8	14.2	18.2	-3.1	2.0	41.0	43.0	17.3	62.4
9	8.9	7.9	-4.0	-8.0	-30.0	-39.0	-6.6	50.9
10	7.0	NA	1.0	NA	41.0	NA	-1.6	NA

Dos grupos de pacientes fueron identificados en términos de GSH de modulación: respondedores y no respondedores. Los que respondieron fueron los que comenzaron el estudio con un bajo nivel de GSH.

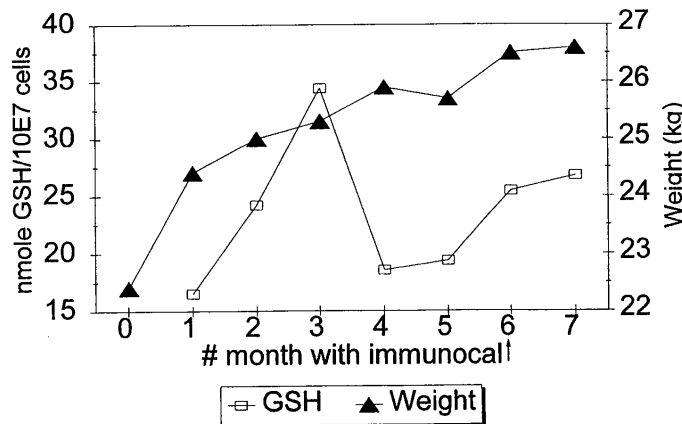


Figura 5. Glutación intracelular en HSC 4. Cada punto representa la media \pm SD de 3 mediciones. \blacktriangle indica el final de estudio.

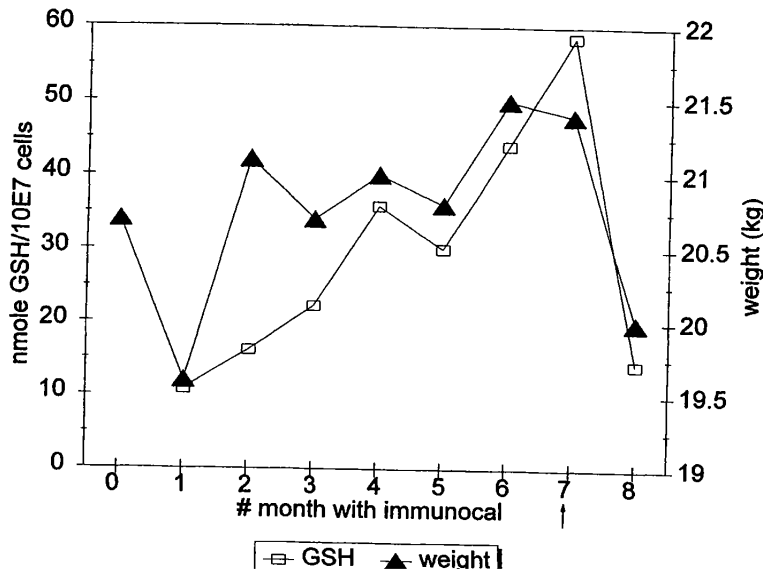


Figura 6. Glutación intracelular en CHUL 1. Cada punto representa la media \pm SD de tres mediciones. \blacktriangle indica el final de estudio.

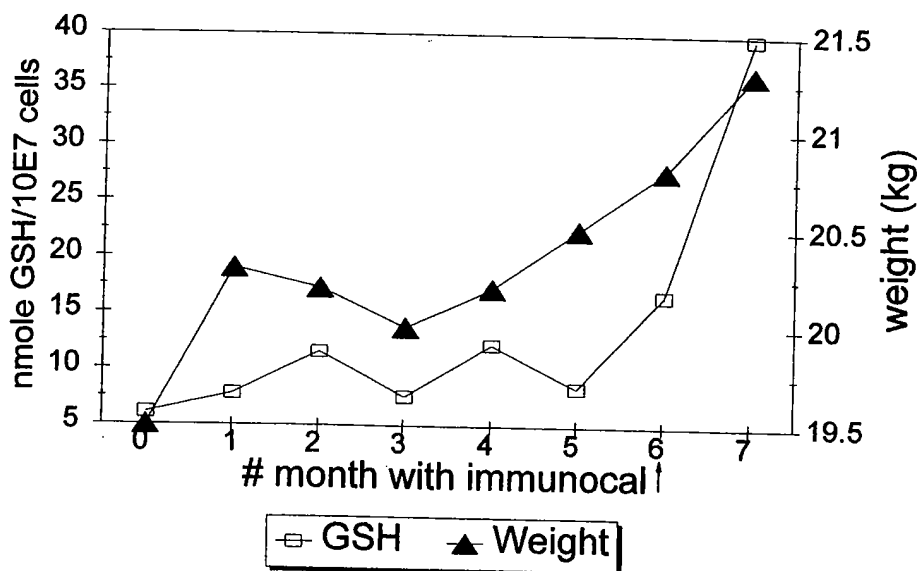


Figura 7. Glutati3n intracelular en MCH 3. Cada punto representa la media +SD de tres mediciones. ▲ indica el final de estudio.

Los pacientes que no responden fueron los que comenzaron con un nivel de GSH normal. Una correlaci3n positiva fue encontrada entre aumento de peso y aumento de GSH (Figuras 5,6,7). No se encontraron cambios en t3rminos del recuento de c3lulas de linfocitos de sangre CD4, pero 2 pacientes mostraron un aumento en el porcentaje de sus c3lulas CD8 y 4 pacientes mostraron una tendencia hacia un aumento en el n3mero de c3lulas NK.

En conclusi3n, este estudio piloto demuestra que IMMUNOCAL™ es muy bien tolerado en ni3os con SIDA y el s3ndrome de desgaste y se asocia con una mejor3a del estado nutricional del paciente como se refleja el peso y en los par3metros antropom3tricos. Por otra parte, la actividad de GSH-promotora de IMMUNOCAL™ in vivo parece ser validado en 6 de cada 10 pacientes. Un estudio aleatorio multic3ntrico internacional est3 actualmente en marcha en Francia y Canad3, en pacientes adultos con SIDA y el s3ndrome de desgaste.

MODULACI3N SELECTIVA DE GLUTATI3N DE LAS C3LULAS DE C3NCER DE MAMA Y EL IMPACTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE C3LULAS CANCEROSAS

La participaci3n espec3fica de GSH en el proceso carcinog3nico es apoyada por el importante papel desempe3ado por este compuesto en la desintoxicaci3n de sustancias cancer3genas por conjugaci3n (26).

Hemos demostrado que la alimentaci3n de GSH promoviendo el HNMPi con los ratones tratados cr3nicamente con dimetilhidrazina (DMH) reduce significativamente el n3mero y tama3o de los carcinomas de colon inducidos por DMH (27,28). Estos tumores de colon parecen ser similares a los encontrados en el ser humano en la medida en que el tipo de lesiones y las caracter3sticas de respuesta de los quimioterap3uticos se refiere (26). La alimentaci3n con HNMPi parece ejercer un efecto inhibitorio no s3lo en el inicio (27) de c3ncer, sino tambi3n en la progresi3n de los tumores (28).

Recientemente, se confirm3 un efecto inhibitorio directo de HNMPi en la replicaci3n de c3lulas de c3ncer humano (21,29,30). En otros estudios celulares de c3ncer humano, el efecto inhibitorio se encontr3 estar relacionado con el suero de alb3mina componente del suero de leche (31) y m3s recientemente a lactoalb3mina (32). La alimentaci3n de la lactoferrina a ratones inhibi3 el crecimiento de tumores s3lidos y, adem3s, redujo la colonizaci3n del pulm3n por melanomas (33). A diferencia de otras prote3nas, el suero de alb3mina se encontr3 tener y exhibir un fuerte efecto anti-mutag3nico en un ensayo in vitro utilizando c3lulas de h3mster (34). Por tanto, es de destacar que en esta HNMPi hemos tenido 3xito en la concentraci3n de suero de alb3mina, a-lactoalb3mina, y lactoferrina, todos que contienen un n3mero significativo de los precursores de GSH. Una posible explicaci3n para estas propiedades recientemente descubiertas de la dieta de prote3na de suero de leche puede ser encontrado en los hallazgos recientes sobre el papel de GSH en la biolog3a del tumor (35).

La b3squeda de formas de inhibir las c3lulas cancerosas sin da3ar las c3lulas normales se ha basado en los 3ltimos a3os en un vano esfuerzo por identificar los par3metros metab3licos en el que las c3lulas cancerosas est3n en desacuerdo con las c3lulas normales. Una de estas funciones podr3a ser la s3ntesis de lo m3s importante de GSH celular.

Pruebas experimentales recientes han revelado una respuesta intrigante de un tumor contra las células normales de la síntesis de los compuestos promotores GSH. Se ha encontrado que los niveles celulares de GSH son varias veces mayor en las células cancerosas humanas que en las células normales adyacentes (35). Este hallazgo está presumiblemente relacionado con su actividad proliferativa. De hecho, el cáncer es la única condición en la que la elevación de tal sistema tan estrictamente regulado como el GSH ha sido reportado. Sin embargo, cuando se añadió una cisteína y el compuesto promotor GSH tales como 2-L-oxothiazolidine-4-carboxilato (OTZ) a las células cultivadas de cáncer de pulmón humanas que muestran niveles muy elevados de GSH al principio, no se observó aumento intracelular, mientras GSH aumentó sustancialmente en las células normales (35). Esta respuesta diferencial es aún más pronunciada "in vivo". Hemos demostrado que en ratas portadoras de tumor, en el tratamiento OTZ de hecho se encontró un agotamiento de GSH en los tumores (36).

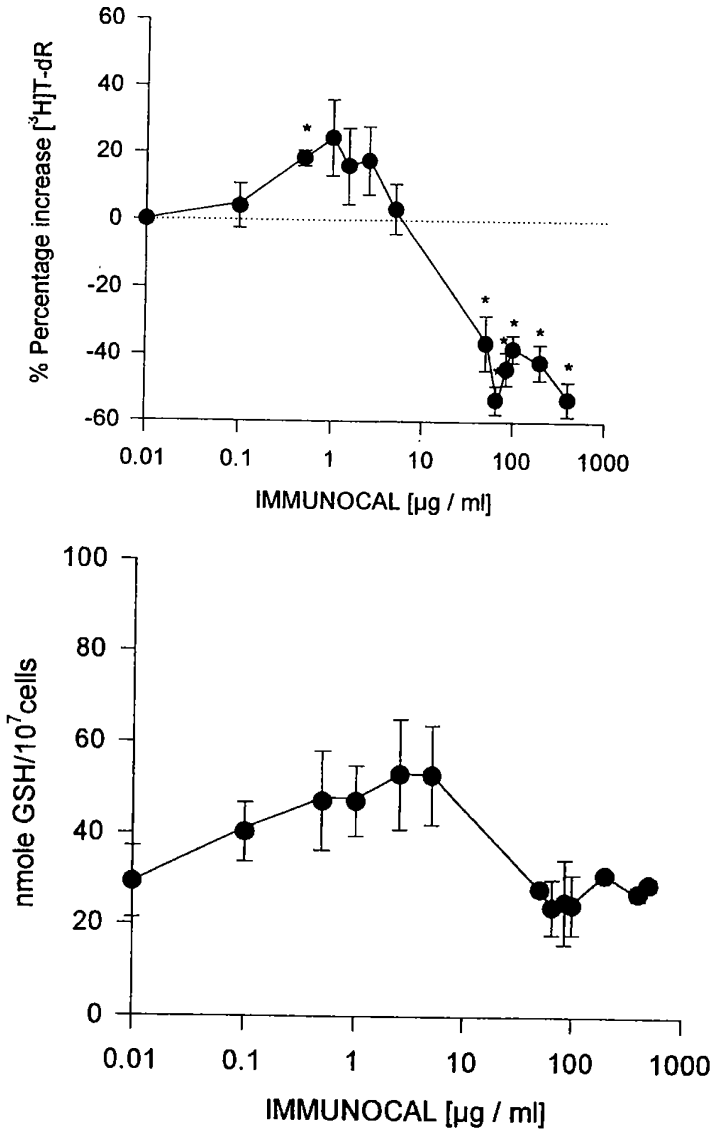


Figura 8. Glutati3n intracelular en MATB WT. Cada punto representa la media \pm SE de tres mediciones. *p < 0.05.

Más espec3ficamente, un ensayo in vitro mostr3 que, en concentraciones que inducen la s3ntesis de GSH y la proliferaci3n en c3lulas humanas normales (Figura I), IMMUNOCALTM caus3 el agotamiento de GSH y la inhibici3n de la proliferaci3n de c3lulas en un carcinoma mamario de rata (Figura 8) y las c3lulas Jurkat T (Figura 9) (21).

La selectividad demostrada en estos experimentos se puede explicar por el hecho de que la s3ntesis de GSH se inhibe negativamente por su propia s3ntesis y puesto que, como se ha mencionado, la l3nea de base GSH intracelular en las c3lulas tumorales es mucho mayor que en las c3lulas normales, es m3s f3cil de alcanzar el nivel en el que la inhibici3n de retroalimentaci3n negativa se produce en este sistema celular que en un sistema celular no tumoral.

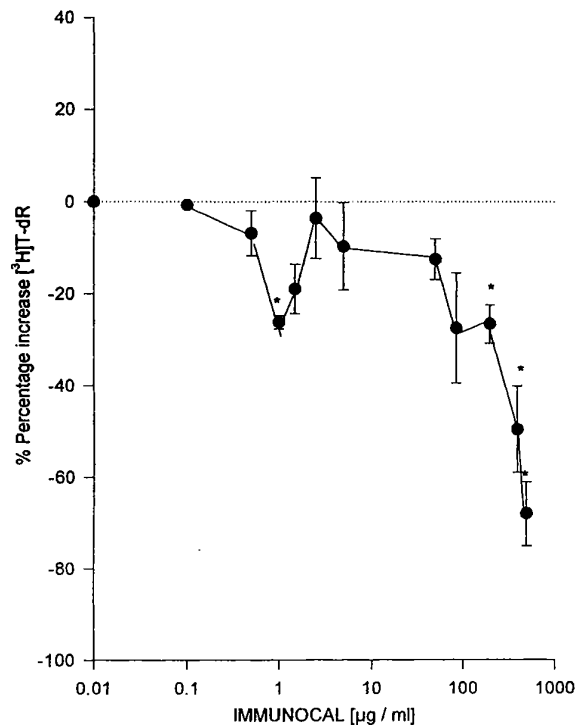


Figura 9. Glutación intracelular en Jurkat. Cada punto representa la \pm SE de tres mediciones. *p <0.05.

HNMPI EN LOS ENSAYOS CLÍNICOS SOBRE EL CÁNCER

Sobre la base de estos experimentos, 5 pacientes con carcinoma metastásico de mama, 1 del páncreas, y 1 del hígado fueron alimentados con 30 g de IMMUNOCAL™ al día durante 6 meses. En 6 pacientes, los niveles de GSH de linfocitos de sangre eran sustancialmente superiores a lo normal al principio, lo que probablemente reflejaba altos niveles de GSH tumorales. A la finalización de los 6 meses de suplementación diaria, 2 pacientes mostraron signos de regresión del tumor, la normalización de los recuentos de hemoglobina y linfocitos periféricos, y una caída sostenida de linfocitos hacia los niveles de GSH normal. Dos pacientes mostraron estabilización del tumor y el aumento de los niveles de hemoglobina. En 3 pacientes, la enfermedad progresó con una tendencia hacia altos niveles de linfocitos GSH (37).

Un problema importante en el uso de agentes quimioterapéuticos en la terapia del cáncer es la protección ofrecida por los mecanismos de defensa de las células cancerosas. Un elemento importante de la protección está representado por GSH, que es un agente de desintoxicación efectiva que es relativamente abundante en las células tumorales. De hecho, cuando la síntesis de GSH es inhibida por butionina sulfoximina (BSO), la actividad de varios agentes quimioterapéuticos tales como agentes alquilantes se incrementa y la resistencia a fármacos puede ser revertida (36-38). Sin embargo, el agotamiento concomitante de GSH en las células normales limita en gran medida la utilidad práctica de esta modalidad de tratamiento.

Recientemente hemos demostrado que un profármaco selectivo GSH tal como OTZ protege algo de tejido normal (36), pero también potencia la actividad de algunos agentes alquilantes (38).

La aparente reducción selectiva de los niveles de GSH tumorales mediante la provisión de un precursor natural de GSH tal como figura en IMMUNOCAL™ parece estar asociado con la inhibición de la proliferación de las células cancerosas in vitro. Este precursor natural de GSH influye favorablemente en la síntesis de GSH en las células normales.

Estos in vitro y los resultados clínicos preliminares indican que esta propiedad recientemente descubierta de HNMPI puede ser un complemento prometedor para el tratamiento nutricional de los pacientes con cáncer sometidos a quimioterapia. Actualmente estamos desarrollando un estudio de fase II en carcinoma de mama, tratando de confirmar que este agotamiento selectiva de GSH puede, de hecho, hacer que las células tumorales sean más vulnerables a la quimioterapia y eventualmente proteger el tejido normal contra el efecto nocivo de la quimioterapia.

ANALOGÍA ENTRE IMMUNOCAL™ (HNMPI) Y LA LECHE HUMANA

La leche humana contiene aproximadamente 80% de proteína de suero y 20% de caseína. Y es contrario para la leche de vaca. Un análisis de la relación de masa de caseína a proteína de suero en la leche de varios mamíferos indica claramente que la leche humana tiene la proporción más baja en cualquier especie de mamífero (39). Sobre la base de nuestros estudios de laboratorio muestran los efectos inmunoprotectores y anticancerígenos de concentrado de proteína de suero de leche de vaca, es tentador especular que este predominio de proteínas de suero en la leche humana es ventajoso y por lo tanto representan una adaptación evolutiva.

Los datos científicos basados en la similitud entre los componentes bioactivos de esta aislado de proteína de leche nativa (HNMPI) de leche de vaca, IMMUNOCAL™, y proteína de suero humano parecen confirmar esta teoría, como se discutirá ahora en más detalle.

Es bien sabido que la lactancia materna es superior al uso de formulas basadas en leche de vaca nutricionalmente similares para la salud de los bebés humanos. La lactancia materna protege contra la otitis media y neumonía (40,41). La leche materna también tiene un efecto protector sobre la incidencia de varios tipos de cáncer en la infancia, incluyendo leucemia, linfomas, tumores óseos, y tumores cerebrales (42). Los niños que son alimentados artificialmente o que son amamantados durante un corto período de tiempo están en mayor riesgo de desarrollar varios tipos de cáncer antes de la edad de 15 años en comparación con los tuvieron lactancia materna a largo plazo (43). Así, el concepto de una actividad biológica, en adición a, pero independiente de la eficacia nutricional, formulado para describir el inmunopotenciador y el promotor GSH- de la actividad de la HNMPI IMMUNOCAL™, puede de hecho aplicar a la lactancia materna de recién nacidos y lactantes. La síntesis de glutatión parece ser el factor decisivo para el beneficio de la salud de HNMPI.

Entonces puede ser apropiada para identificar las características comunes a HNMPI y proteínas de suero humano que son capaces de influir en la síntesis de GSH en el huésped. La cisteína, un factor limitante crucial en la síntesis de GSH, es tan abundante en proteína de suero de leche de vaca, como lo es en toda la proteínas de la leche humanos y varias veces más abundantes que en toda la leche de vaca (39), ya que la mayoría de las caseínas contienen ya sea no cisteína o uno o dos residuos de cisteína (19). Como se mencionó anteriormente, los estudios demostraron que las proteínas de la leche más termolábil, son específicamente, la albúmina sérica, α -lactoalbúmina, y lactoferrina, son cruciales para la expresión de la bioactividad de HNMPI. Como se muestra en la Tabla 1, estas proteínas son ricas en cistina y residuos de glutamilstina, precursores naturales de GSH. La presencia de estos dipéptidos en el producto IMMUNOCAL™ es una característica compartida con la leche humana (Tabla 4).

Tradicionalmente, se ha defendido que la leche de vaca "humanizada" debe contener más α -lactoalbúmina porque esta proteína es dos veces más abundante en la leche humana. Sobre la base de nuestros resultados experimentales, se propone en cambio que el factor de salud principal en la leche humana, no desnaturalizado por el calor de la pasteurización, se debe al predominio de las proteínas termolábiles ricas en cistina y contienen el dipéptido Glu-Cys que son característicos de la bioactivo HNMPI, específicamente, albúmina de suero, α -lactoalbúmina, y lactofenina. Este HNMPI difiere de otra proteína de suero de leche disponible en el mercado concentrados en tener un contenido relativamente alto de albúmina de suero (aproximadamente 10%), lactoferrina (aproximadamente 0,65%), y α -lactoalbúmina (aproximadamente 28%). La variedad de enfermedades contra las que la lactancia materna parece ser eficaz sugiere un mecanismo de protección más amplio que implica GSH celular y su efecto sobre los radicales libres, la proliferación de linfocitos, y la desintoxicación de carcinógenos y otros xenobióticos.

Tabla 4. Composición Proteína de Vaca y composición de la leche humana (g / litro)

Component	Cow milk	Human milk
Casein (g/L)	26	3.2
β -Lactoglobulin (g/L)	3.2	Negligible
α -Lactalbumin (g/L)	1.2	2.8
Serum albumin (g/L)	0.4	0.6
Lactoferrin (g/L)	0.14	2.0
Total cystine (mol/L)	8.19×10^{-4}	13.87×10^{-4}
Total cystine (mg/g protein)	6.4	38.7

Source: Ref. 19; Jenness R. Inter-species comparison of milk proteins. In Fox, ed. *Developments in dairy chemistry*—1. New York: ASP; 1982:8

CONCLUSIÓN

La actividad biológica de las proteínas aisladas de leche de vaca en IMMUNOCAL™ depende de la preservación de esas proteínas lábiles que comparten las mismas proteínas predominantes de la leche humana y el mismo y extremadamente raro componente promotor GSH. El agotamiento de GSH celular ha sido implicado en la patogénesis de una serie de condiciones degenerativas y estados de enfermedad, incluyendo la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, arteriosclerosis, cataratas, fibrosis quística, la desnutrición, envejecimiento, SIDA y cáncer (9).

Esta modulación nutraceutica recién descubierta del GSH por el uso del aislado humanizado de proteína de suero de leche nativa de origen bovino en el SIDA y el cáncer, podría encontrar otras aplicaciones en donde una enfermedad por estrés oxidativo y la patología del metabolismo de GSH están implicados en gran medida. Un estudio farmacoepidemiológico extensivo del metabolismo del GSH y métodos estandarizados de medición de GSH intracelular aplicable en los ensayos clínicos son necesarios con el fin de definir mejor la aplicación clínica de este nuevo tipo de terapia.

REFERENCIAS

1. Bounous G, Stevenson MM, Kongshavn PAL. Influence of dietary lactalbumin hydrolysate on the immune system of mice and resistance to Salmonellosis J Infect Dis 1981; 144:281.
2. Bounous G, Kongshavn PAL. Influence of dietary proteins on the immune system of mice. J Nutr 1982; 112:1747-1555. 460 Baruchel et al.
3. Bounous G, Letoumeau L, Kongshavn PAL. Influence of dietary protein type on the immune system of mice. J Nutr 1983; 113:1415-1421.
4. Bounous G, Kongshavn PAL. Differential effect of dietary protein type on the B-cell and T-cell immune response in mice. J Nutr 1985; "521403-1408.
5. Bounous G, Shenouda N, Kongshavn PAL, Osmond DG. Mechanism of altered B-cell response induced by changes in dietary protein type in mice. J Nutr 1985; 115:1409-1417.
6. Bounous G, Kongshavn PAL, Gold P. The immunoenhancing property of dietary whey protein concentrate. Clin Invest Med 1988; 11:271-278.
7. Bounous G, Kongshavn PAL. Influence of protein type in nutritionally adequate diets on the development of immunity. In Friedman M, ed. Absorption and utilization of amino acids. Boca Raton, VFlorida: CRC Press; 1989; 2:219-223.
8. Parker N, Goodrum KJ. A comparison of casein, lactalbumin, and soy protein effect on the immune response to a T-dependent antigen. Nutr Res 1990; 10:781-792.
9. Bounous G, Gold P. The biological activity of undenatured whey proteins: role of glutathione. Clin Invest Med 1991; 14:296-309.
10. Hirai R, Nakai S, Kikuishi H, Kawai K. Evaluation of the immunological enhancement activities of Immunocal. Otsuka Pharmaceutical Co. Cellular Technology Institute; Dec. 13, 1990.
11. Noelle R], Lawrence DA. Determination of glutathione in lymphocyte and possible association of redox state and proliferative capacity of lymphocytes. Biochem J 1981; 198:571-579.
12. Fidelus RK, Tsan MF. Glutathione and lymphocyte activation: a function of aging and auto-

immune disease. *Immunology* 1987; 61:503-508.

13. Bounous G, Gervais F, Amer V, Batist G, Gold P. The influence of dietary whey protein on tissue glutathione and the diseases of aging. *Clin Invest Med* 1989; 12:343-349.

14. Meister A. The antioxidant effects of glutathione and ascorbic acid. In Pasquier et al., eds. *Oxidative Stress. Cell Activation and Viral Infection*. Basel: Birkhauser Verlag; 1994: 101-110.

15. Williamson JM, Boettcher B, Meister A. Intracellular cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:6246-6249.

16. Anderson ME, Meister A. Transport and direct utilisation of gamma-glutamylcyst(e)ine for glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80:707-711.

17. Bounous G, Batist G, Gold P. Immunoenhancing property of dietary whey protein in mice: role of glutathione. *Clin Invest Med* 1989; 12:154-161.

18. Droege W, Eck HP, Mimm S, Galter D. Abnormal Redox regulation in HIV infection and other immunodeficiency diseases. In Pasquier C et al., eds. *Oxidative Stress, Cell Activation and Viral Infection*. Basel: Birkhauser Verlag; 1994: 285-301.

19. Eigel WM, Butler JE, Emstrom CA, et al. Nomenclature of proteins of cow's milk, fifth revision; *J Dairy Sci* 1984; 67:1599-1631.

20. Goodman RE, Schanbacher FL. Bovine lactoferrin mRNA: sequence, analysis and expression in the mammary gland. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180:75-84.

21. Baruchel S, Viau G. In vitro selective modulation of cellular glutathione by a humanized native milk protein isolate in mammal cells and rat mammary carcinoma model. *Anticancer Res* April, 1996; 15: 1095-1100.

22. Reynolds P, Jellinger K, Youdim MBH. Transition metals, ferritin, glutathione and ascorbic acid in Parkinsonian brains. *J Neurochem* 1989; 52:515~520.

23. Belleville F, Penin F, Cuny G. Lipid peroxidation and free radical scavengers in Alzheimer's disease. *Gerontology* 1989; 35:275-282.

24. Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Hayashi T, Asai K, Kuzuya F. Protective role of intracellular glutathione against oxidized low density lipoprotein in cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 163:1466-1472.

Nutriceutical Modulation of Glutathione 461

25. Calvin HI, Medvedovsky C, Worgul BV. Near total glutathione depletion and age-specific cataracts induced by buthionine sulfoximine in mice. *Science* 1986; 28:553-555.

26. Orrenius S, Thor H, Bellomo G, Moldeus P. Glutathione and tissue toxicity In Paton W, Mitchell I, eds. *9th International Congress of Pharmacology*, London, England. London: MacMillan; 1984:57-68.

27. Bounous G, Papenburg R, Kongshavn PAL, Gold P, Fleiser D. Dietary whey protein inhibits the development of dimethylhydrazine induced malignancy. *Clin Invest Med* 1988; 11:213-217.
28. Papenburg R, Bounous G, Fleischer D, Gold P. Dietary milk proteins inhibit the development of dimethylhydrazine-induced malignancy. *Tumor Biol* 1990; 11:129-136.
29. Bourtourault M, Buleon R, Samperes S, Jouans Effects des proteines du lactoserum bovin sur la multiplication de cellules cancéreuses humaines. *CR Soc Biol* 1991; 1852319-323.
30. Barta O'Barta VD, Crisman LM, Akers RM. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by whey. *Am J Vet Dis* 1991; 512:247-253.
31. Laursen L, Briand P, Lykkesfldt AE. Serum albumin as a modulator of growth of the human breast cancer cell line MCF-7. *Anticancer Res* 1990; 10:343-352.
32. Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal H, Svangorg C. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:8064-8068.
33. Bezault J, Bhimani R, Wiprovnich J, Furmanski P. Human lactoferrin inhibits the growth of solid tumours and development of experimental metastases in mice. *Cancer Res* 1994; 54:2310-2312.
34. Bosselaers 1E, Caessens PW, Banboeket MA. Differential effects of milk proteins, BSA and soy on 4NOO-or MNNG-induced SCE's ub V79 cells. *Food Chem Toxicol* 1994; 32:905-909.
35. Russo A, Degraff W, Friedman N, Mitchell FB. Selective modulation of glutathione levels in human normal versus tumour cells and subsequent differential response to chemotherapy drugs. *Cancer Res.* 1986; 26:2845-2848.
36. Baruchel S, Wang T, Farah R, Batist G. In vivo selective modulation of tissue glutathione in a rat mammary carcinoma model. *Biochem Pharmacol* 1995; 50:1505-1508.
37. Kennedy RS, Konok GP, Bounous G, Baruchel S, Lee T. The use of a whey protein concentrate in the treatment of patients with metastatic carcinoma: phase 1-11 clinical study. *Anticancer Res* 1995; 15:2643-2650.
38. Jamali M, Wang T, Baruchel S, Lee T. Modulation of glutathione by a cysteine prodrug enhances in vivo tumor responses. *I Pharrn Exp Ther* 1996; 276:1169-1173.
39. Bounous G, Kongshavn PAL, Taveroff A, Gold P. Evolutionary traits in human milk proteins. *Medical Hypothesis* 1988; 27:133-140.
40. Duncan B, By J, Holberg C], Wright AL, Martinez F, Taussig LM. Exclusive breast-feeding for at least 4 months protects against otitis media. *Paediatrics* 1993; 91:867f1872.
41. Aniasson G, Alm B, Andersson B, Hakansson A. Prospective cohort study on breast feeding and otitis media in Swedish infants. *Paediatrics* 1982; 70:239-245.
42. Mather G, Gupta N, Mathur S, Gupta U, Pradan S. Breast feeding and childhood cancer. *Indian Paediatr* 1993', 30:652-657.
43. Davis MK, Savitz DA, Grau'oard BI. Infant feeding and childhood cancer. *Lancet* 1988; 1:3