

Artículo reseña

PÉPTIDOS BIOACTIVOS DERIVADOS DE LAS PROTEÍNAS LÁCTEAS: PROPIEDADES Y APLICACIONES PRINCIPALES

Yuleivys Oliva* y S. Vega**

**Dir. Salud y Producción Animal e-mail: yuleivys@censa.edu.cu. Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. **Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X), Calzada del Hueso 1100, Colonia Villa Quietud, 04960, México, D.F.*

RESUMEN: Las proteínas lácteas son fuente de una gran variedad de péptidos biológicamente activos. Estos péptidos son inactivos dentro de la secuencia de las proteínas precursoras, pero pueden ser liberados, mediante proteólisis enzimática y actuar, tanto como moduladores exógenos, como endógenos. Aunque la relación estructura-actividad de muchos de ellos no se ha establecido aún completamente, se han encontrado características estructurales comunes en péptidos con una misma bioactividad. Además muchos péptidos revelan propiedades multifuncionales. Entre las actividades fisiológicas más importantes de los péptidos derivados de las proteínas lácteas se destacan su capacidad de actuar como ligandos del receptor opioide con actividad agonista y antagonista, como inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (péptidos antihipertensivos), como inmunomoduladores, antimicrobianos, antitrombóticos, antioxidantes y como transportadores de minerales, fundamentalmente de calcio. Los péptidos derivados de las proteínas de la leche pueden ser producidos a escala industrial, y por tanto pueden emplearse como ingredientes de alimentos funcionales, así como en preparaciones farmacéuticas. Este trabajo aborda los principales grupos de péptidos bioactivos, basados en su función fisiológica y provee un resumen de sus principales características y posibles aplicaciones.

(Palabras claves: péptidos bioactivos; proteínas lácteas; péptidos antihipertensivos; péptidos inmunomoduladores; péptidos opioides)

MILK BIOACTIVE PEPTIDES: MAIN PROPERTIES AND APPLICATIONS.

ABSTRACT: Milk proteins are source of many biologically active peptides. These peptides are inactive within the sequence of the precursor proteins, but they can be released by enzymatic proteolysis and they may act as exogenous and endogenous regulatory compounds. Although the structure-activity relationship of many bioactive peptides has not yet been established completely, there are many peptides with a defined activity that have common structural features. Also, many peptides reveal multifunctional properties. The most important physiologic activities of milk derived peptides are their capacity to act as opioid receptor ligands with agonistic and antagonistic activities, as inhibitors of the Angiotensin-converting-enzyme (antihypertensive peptides), as immunomodulants, as antimicrobials, as antithrombotics, as antioxidants and as mineral carriers, specially of calcium. Milk derived peptides can be produced on an industrial-scale, and therefore they can be used as ingredients of functional foods, as well as in pharmaceutical preparations. This review approaches the main groups of bioactive peptides, based on their physiologic function and it provides a summary of their main characteristics and possible applications.

(Key words: bioactive peptides; milk proteins; antihypertensive peptides; immunomodulant peptides; opioid peptides)

INTRODUCCIÓN

En 1979 se describió por primera vez la presencia de péptidos bioactivos en la secuencia aminoacídica de las proteínas lácteas. Aunque otras proteínas, tanto de origen animal como vegetal, contienen secuencias biológicamente activas; la leche constituye la principal fuente de péptidos bioactivos (2). Generalmente, estos péptidos son inactivos dentro de la secuencia de la proteína precursora y pueden ser liberados y activados mediante la proteólisis enzimática, por ejemplo durante la digestión gastrointestinal o el procesamiento de los alimentos. Una vez liberados en el organismo, pueden provocar diversas respuestas fisiológicas, por lo que representan un gran potencial como nutracéuticos y para aplicaciones farmacéuticas.

Se han utilizado tres estrategias fundamentales para la identificación y caracterización de tales péptidos: el aislamiento a partir de hidrolizados enzimáticos *in vitro* y/o gastrointestinales *in vivo* de las proteínas precursoras y la síntesis química de fragmentos peptídicos que tienen estructura semejante a péptidos de actividad conocida (42, 43). Existen evidencias considerables de que muchos péptidos bioactivos poseen capacidad multifuncional. Este trabajo aborda los principales péptidos bioactivos, basados en su función fisiológica y provee un resumen de sus principales características y posibles aplicaciones.

Actividad biológica y relación estructura-actividad.

A diferencia de los péptidos bioactivos endógenos, muchos péptidos derivados de proteínas lácteas poseen propiedades multifuncionales, o sea, una secuencia peptídica específica con una o más actividades biológicas diferentes (Tabla 1). Por ejemplo, algunas regiones en la estructura primaria de las caseínas contienen secuencias peptídicas solapadas, que poseen diferentes efectos biológicos. Estas regiones se consideran "zonas estratégicas" y están protegidas parcialmente de la proteólisis.

Actividad opioide: agonista y antagonista

Los receptores opioides (tipo μ , δ y κ) están localizados en los sistemas nervioso, endocrino e inmunológico, así como en el tracto intestinal de los mamíferos y pueden interactuar, tanto con sus ligandos endógenos como con los exógenos y antagonistas. Los opioides, o sea los ligandos del receptor opioide con actividad agonista pueden tener estructura peptídica o alcaloide. Los ligandos endógenos de los receptores opioides que poseen la secuencia N-terminal Tyr-Gly-

Gly-Phe son llamados péptidos opioides "típicos" y son derivados de moléculas precursoras como la proencefalina, prodinorfina y propiomelanocortina (24). Los péptidos opioides "atípicos" tienen secuencias N-terminal diferentes y son derivados de varias proteínas como α y β -caseínas, α -lactalbúmina y β -lactoglobulina. Sin embargo, ambos tipos de péptidos tienen como característica estructural común la presencia de un residuo de tirosina en el extremo N-terminal (excepto los péptidos opioides derivados de la a-caseína) y la presencia de otro residuo aromático (fenilalanina o tirosina) en la tercera o cuarta posición (28). El potencial negativo, localizado en la vecindad del grupo hidroxil fenólico de la tirosina parece ser esencial en la actividad opioide. Por su parte, el residuo de prolina es crucial para la actividad biológica de los péptidos opioides, debido a que mantiene la orientación apropiada de las cadenas laterales de la tirosina y la fenilalanina.

Los péptidos opioides derivados de las proteínas lácteas modulan el comportamiento social y producen analgesia después de la administración intracerebral a los animales de experimentación. También prolongan el tiempo de tránsito intestinal, exhiben acción antidiarreica, modulan el transporte intestinal de aminoácidos e influyen en el metabolismo postprandial al estimular la secreción de insulina y somatostatina (41).

Los principales péptidos opioides exógenos son fragmentos de la secuencia 60-70 de la β -caseína y están caracterizados como ligandos tipo μ . Son comúnmente llamados b-casomorfina, debido a su naturaleza exógena y a su actividad similar a la morfina (opio). También son llamados exorfinas o formonas (de "food hormones") (62). Estos péptidos también se encuentran en posiciones análogas en la β -caseína humana, de oveja y búfala (57). En todos los ensayos realizados el heptapéptido β -casomorfina-5 y el tetrapéptido β -casomorfina.4-amida (morfeceptina), aislados de la digestión *in vitro* de la α -caseína bovina, fueron los opioides más potentes. La ausencia del residuo de tirosina en la des-tyr- β -casomorfina-7 conduce a la pérdida completa de la actividad opioide (10).

Como se mencionó anteriormente de la a-caseína también se derivan péptidos opioides (α -casomorfina). Específicamente, en hidrolizados con pepsina de α_{s1} -caseína se encontraron tres, que corresponden a los fragmentos 90-96, 90-95 y 91-96, todos ligandos del receptor δ (34).

TABLA 1. Ejemplos de péptidos bioactivos derivados de proteínas lácteas bovinas./ *Examples of bioactive peptides derived from bovine milk proteins*

No	Secuencia peptídica ^a	Nombre	Fragmento	Actividad
1.	YFPFGPIPNSL	β -casomorfina-11	β -CN (f 60-70)	Agonista opioide
2.	YFPFGPI	β -casomorfina-7	β -CN (f 60-66)	Agonista opioide, inhibidor de la ECA, inmunomodulador
3.	YFPFG	β -casomorfina-5	β -CN (f60-64)	Agonista opioide, inhibidor de la ECA
4.	RYLGYLE	α -caseinexorfina	α_{s1} -CN (f90-96)	Agonista opioide,
5.	RYLGYL	α -caseinexorfina	α_{s1} -CN (f90-95)	Agonista opioide,
6.	YLGYLE	α -caseinexorfina	α_{s1} -CN (f91-96)	Agonista opioide,
7.	YGLF.NH ₂	α -lactorfina	α -LA (f50-53)	Agonista opioide, inhibidor de la ECA
8.	YLLF.NH ₂	β -lactorfina	β -LG (f102-105)	Agonista opioide, inhibidor de la ECA
9.	ALPMHIR		β -LG (f142-148)	inhibidor de la ECA
10.	YL		β -LG (f102-103), α -s1-CN (f91-92)	inhibidor de la ECA
11.	LF		β -LG (f104-105)	inhibidor de la ECA
12.	YGFQNA	Serorfina	SA (f399-404)	Agonista opioide
13.	SRYPY.OCH ₃	Casoxina 6	κ -CN (f33-38)	Antagonista opioide
14.	YIPIQYVLSR	Casoxina C	κ -CN (f25-34)	Antagonista opioide
15.	YVPFPPF	Casoxina D	κ -CN (f158-164)	Antagonista opioide
16.	AVPYPQR	β -casocinina-7	β -CN (f177-183)	inhibidor de la ECA
17.	YQQPVLGPVR	β -casocinina-10	β -CN (f193-202)	inhibidor de la ECA, inmunomodulador
18.	FFVAP	α_{s1} -casocinina-5	α_{s1} -CN (f23-27)	inhibidor de la ECA
19.	TTMPLW	α_{s1} -casocinina-6	α_{s1} -CN (f194-199)	inhibidor de la ECA, inmunomodulador
20.	FPEVFGK	α_{s1} -casocinina-7	α_{s1} -CN (f28-34)	inhibidor de la ECA
21.	PGPIPNSL	inmunopéptido	β -CN (f63-68)	inmunomodulador
22.	LLY	inmunopéptido	β -CN (f191-193)	inmunomodulador
23.	YG		α -LA (f50-51) (f18-19), κ -CN (f38-39)	inhibidor de la ECA, inmunomodulador
24.	YGG		α -LA (f18-20)	inmunomodulador
25.	RELEELNVPGEIVES*LS*S*S*EESITR	caseinofosfopéptido	β -CN (f1-25)4P	transportador de calcio
26.	DIGS*ES*TEDQAMEDIM	caseinofosfopéptido	α_{s1} -CN (f43-58)2P	transportador de calcio
27.	QMEAES*IS*S*S*EEIVPNS*VEQK	caseinofosfopéptido	α_{s1} -CN (f59-79)5P	transportador de calcio
28.	FQCRRWQWRMKKLGAPSITCVRRAF	lactoferricina	LF(f17-41)	antimicrobiano
29.	MAIPPCKKNQDK	casoplatelina	κ -CN (f106-116)	antitrombótico

Otros opioides peptídicos son la α -lactorfina y la β -lactorfina, los cuales corresponden a los fragmentos 50-53 de las α -lactoglobulinas humana y bovina y al fragmento 102-105 de la β -lactoglobulina bovina, respectivamente. También se aisló la serorfina, a partir del fragmento 399-404 de la albúmina sérica.

Por otro lado, en contraste con la actividad opioide agonista de la mayoría de los fragmentos de la α y β caseína, todos los péptidos derivados de la κ -caseína se comportan como antagonistas opioides, o sea suprimen la actividad agonista de la encefalina y son llamados casoxinas (57).

Se han aislado antagonistas opioides en las κ -caseínas humana y bovina y de la α_{s1} -caseína (11). Además, se encontró la lactoferroxina en la lactoferrina humana (69). Igualmente, se aislaron varias casoxinas sintéticas modificadas por metoxilación durante el proceso de aislamiento, las cuales corresponden a las secuencias de la κ -caseína 33-38, 34-38 y 35-38. Las casoxinas modificadas químicamente fueron más activas que los fragmentos no metoxilados. El fragmento tríptico, que corresponde a los residuos 25-34 de la κ -caseína bovina, conocido como casoxina C, mostró una actividad opioide antagonista relativamente elevada en comparación con los péptidos esterificados (11). Las casoxinas son ligandos del receptor opioide de tipo m con relativamente baja potencia antagonista comparada con la naloxona.

Inhibición de la enzima convertidora de angiotensina (ECA)

La ECA es una enzima multifuncional que está localizada en diferentes tejidos y desempeña un papel fisiológico clave en la regulación de los niveles locales de muchos péptidos bioactivos endógenos. La ECA está asociada con el sistema renina-angiotensina, regulador de la presión sanguínea periférica, donde la inhibición de esta enzima provoca un efecto antihipertensivo. La ECA elimina dos aminoácidos del extremo C-terminal de la angiotensina I para formar el octapéptido angiotensina II, el cual es el mayor compuesto antihipertensivo conocido. La angiotensina II reduce el flujo sanguíneo y por tanto, disminuye la excreción renal de líquidos y sales. Además, esta enzima cataliza la inactivación del vasodilatador bradicinina (51).

La inhibición de la ECA puede influir en diferentes sistemas reguladores del organismo, involucrados en la modulación de la presión sanguínea, el sistema inmunológico y el sistema nervioso.

Muchas proteínas constituyen fuentes de péptidos inhibidores de la ECA (67, 68). Este es el caso de las caseínas, cuyos fragmentos son conocidos como casocininas. Por ejemplo en las secuencias 23-27 de la α_{s1} -caseína bovina y 177-183 de la β -caseína se encuentran casocininas muy activas. También poseen la misma propiedad los fragmentos 23-34 y 194-199 de la α_{s1} -caseína y 193-202 de la β -caseína. Sin embargo, el fragmento opioide β -casomorfina-7 posee una baja actividad (47). Las casocininas más potentes se encontraron en las regiones 39-52 de la β -caseína humana y 63-65 de la κ -caseína humana. Además se

han sintetizado numerosos péptidos que corresponden a fragmentos de la caseína humana (57).

Recientemente Fuglsang *et al.* (21) evaluaron, por primera vez *in vivo*, la actividad inhibitoria de la ECA de péptidos derivados de la leche. En este experimento, en que se usaron 3 modelos diferentes, se encontraron niveles relativamente moderados de actividad, incluso, en péptidos que han mostrado actividad hipotensiva en modelos cardiovasculares importantes (Ile-Pro-Pro, Val-Pro-Pro y Lys-Val-Leu-Pro-Val-Pro). En tales casos es probable dicho efecto no esté mediado por una inhibición de la ECA si no de otras rutas. La razón por la cual no se encuentra una marcada actividad *in vivo* pudiera ser que los péptidos sean degradados rápidamente en el torrente sanguíneo.

Otras proteínas lácteas también dan origen a péptidos con propiedades antihipertensivas, tal es el caso de la β -lactoglobulina y α -lactalbúmina, cuyo fragmento 104-108 es el más activo de los péptidos del suero que inhiben la ECA (52). Las secuencias correspondientes a la β -lactofina y dipéptidos relacionados también se han identificado como péptidos inhibidores de la ECA con moderada actividad. Según Sipola *et al.* (61) la α -lactofina y la β -lactofina mejoran la relación vascular en ratas adultas espontáneamente hipertensas.

De igual modo, se conoce que el fragmento 142-148 de la β -lactoglobulina puede modular la liberación del vasoconstrictor endotelina-1 por parte de las células endoteliales, lo cual pudiera ser otro posible mecanismo para explicar su efecto antihipertensivo (36).

En un estudio reciente, se encontraron varios péptidos inhibidores de la ECA mediante la hidrólisis de leche de 6 especies diferentes con una proteinasa de *Lactobacillus helveticus* PR4. Entre los péptidos más significativos se encuentran los fragmentos 24-47 y 169-193 de la α_{s1} -caseína bovina y 58-76 de la β -caseína. En leche ovina se destacan los fragmentos 182-185 y 186-188 de la α_{s2} -caseína y 1-6 de la α_{s1} -caseína. Asimismo, en cabras presentan actividad los péptidos 182-187 de la α_{s2} -caseína y 58-65 de la β -caseína, mientras que en búfalo es, fundamentalmente, el fragmento 58-66 de la β -caseína. (49)

Aunque la relación estructura función de los péptidos inhibidores de la ECA no se ha establecido aún estos péptidos muestran algunas características comunes. Las correlaciones estructura-actividad entre diferentes péptidos indican que la secuencia C-terminal del sustrato influye en el enlace a la ECA. Los

residuos del tripéptido C-terminal pueden interactuar con los sitios S_1 y S_2 del sitio activo de la ECA. Esta enzima parece preferir sustratos o inhibidores competitivos, que contengan residuos aminoácidos hidrofóbicos (aromáticos o de cadenas laterales) en cada una de las tres posiciones del extremo C-terminal. La mayoría de las casocininas poseen residuos de prolina, lisina o arginina como residuo C-terminal. Los datos estructura-actividad sugieren que la carga positiva de los grupos guanidinio del extremo C-terminal de la arginina y ϵ -amino de la cadena lateral de la lisina, contribuyen a su actividad como inhibidor (40). Se plantea que el mecanismo de inhibición de la ECA también involucra la interacción con sitios, que normalmente no están ocupados por sustratos o con un sitio de enlace a un inhibidor aniónico que es diferente al sitio catalítico de la enzima. Los potenciales electrostáticos moleculares de los péptidos inhibidores de la ECA poseen un patrón característico diferente al de las moléculas inactivas, el cual se caracteriza por un potencial positivo localizado casi en la región C-terminal (40).

Efecto inmunomodulador

Se han detectado varios péptidos inmunomoduladores derivados de la caseína (22). Entre ellos se encuentran los fragmentos 194-199 de la α_{s1} -caseína (también es inhibidor de la ECA) y 63-68 (región C-terminal de la b-casomorfina-11) y 191-193 de la β -caseína, los cuales estimulan la fagocitosis de glóbulos rojos de cabras por macrófagos peritoneales de ratón y poseen un efecto protector en ratones frente a la infección por *Klebsiella pneumoniae* después de la administración intravenosa de estos péptidos (48). La secuencia inmunopeptídica en la β -caseína humana corresponde a los residuos 54-59 (50).

El fragmento C-terminal 193-209 de la β -caseína (contiene la β -casocinina-10), el cual fue aislado a partir de la digestión con pepsina-quimosina de la caseína bovina, induce una proliferación significativa de linfocitos de ratas (14). En 1996, Kayser y Meisel (27) plantearon que la inmunoreactividad de los linfocitos humanos de sangre periférica se estimuló o suprimió producto de varios péptidos bioactivos derivados de proteínas de la leche. Los péptidos Tyr-Gly y Tyr-Gly-Gly, correspondientes a fragmentos de la α -lactoalbúmina bovina (N-terminal de la α -lactoferrina) y κ -caseína, respectivamente, incrementan sustancialmente la proliferación de linfocitos de sangre periférica. Por su parte, la β -casocinina-10 y la β -

casomorfina-7 mostraron tanto supresión como estimulación de linfocitos, en dependencia de los niveles de concentración (41). Más recientemente, Meisel y Günther (45) demostraron la capacidad de los fosfopéptidos, específicamente del fragmento tetrafosforilado 1-25 de la β -caseína (β -CN (f1-25)4P), de modular la actividad celular al inhibir la proliferación de linfocitos humanos de sangre periférica.

Por otra parte, a la lactoferrina también se le han atribuido propiedades inmunomoduladoras, ya que disminuye la liberación de las interleucinas 1 y 2 y del factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y refuerza la citotoxicidad celular de los monocitos y asesinas naturales. La lactoferrina se une con gran afinidad al lípido A, el componente tóxico del lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram-negativas. La interacción del LPS con los monocitos/macrófagos conduce a la producción y liberación de TNF- α , el cual es un inductor del shock séptico. Justamente, la lactoferrina, inhibe la interacción de dicho LPS con las moléculas CD4 de los monocitos/macrófagos, mediante competencia por la proteína de unión a LPS (8, 63).

Se han obtenido también péptidos con actividad inmunomoduladora, a partir de la hidrólisis con peptidasas de *Lactobacillus paracasei* NCC2461 de péptidos trípticos y quimotrípticos de la β -lactoglobulina. Esta actividad viene dada fundamentalmente por una represión de la estimulación de los linfocitos, un incremento en la producción de IL-10 y disminución de la secreción de IFN- γ e IL-4 (53).

La lactoferrina, la cual fue inicialmente identificada como un péptido antimicrobiano obtenido de la digestión con pepsina de la lactoferrina, también es capaz de activar por sí sola la inmunidad (66).

Las relaciones estructura-actividad y el mecanismo por el cual los péptidos provenientes de proteínas de la leche poseen su efecto inmunomodulador no se han definido aún. Sin embargo, los resultados obtenidos con linfocitos de sangre periférica sugieren, que los péptidos opioides pueden afectar la inmunoreactividad de los linfocitos por mediación del receptor opioide. De hecho, existe una notable relación entre el sistema inmunológico y los péptidos opioides, debido a que los receptores opioides tipo μ para endorfinas están presentes en los linfocitos T y leucocitos fagocíticos humanos (18). Además, se conoce que los leucocitos y macrófagos expresan receptores para muchos mediadores biológicamente activos. Se sugiere que un residuo de arginina en el extremo N o C-terminal puede ser reconocido por receptores de su-

perficie de membrana específicos. La β -casocinina-10 (inmunomodulador e inhibidor de la ECA), así como otros péptidos inhibidores de la ECA, poseen un residuo de arginina en la región C-terminal (41).

Enlace a minerales

Es conocido que los fosfopéptidos pueden formar organofosfatos solubles y pueden actuar como transportadores de diferentes minerales, principalmente de calcio (44). La bioactividad de los fosfopéptidos obtenidos de la hidrólisis trípica de la caseína se informó hace más de 50 años cuando se encontró que ellos mejoran el equilibrio del calcio en recién nacidos raquíticos (58).

Alrededor del 30 % del fósforo de la leche se encuentra unido mediante enlaces monoéster a los residuos de serina de la caseína. Por esta razón se han podido aislar varios fosfopéptidos derivados de la α_{s1} , α_{s2} y β -caseína mediante la proteólisis enzimática *in vitro* o por la digestión intestinal (5). Ejemplo de ello es el fragmento 66-74 de la α_{s1} -caseína.

Estos caseinofosfopéptidos pueden asociarse con el fosfato de calcio sobre la superficie de los dientes para formar reservorios de iones de calcio y fosfato que mantienen un estado de saturación con respecto al esmalte dental. De esta forma, inhiben la desmineralización a la vez que promueven la remineralización de dicho esmalte (1).

La mayoría de los fosfopéptidos contienen un cluster de serina-fosfato y ácido glutámico compuestos por una secuencia de tres grupos del primero seguido por dos del segundo. Las cargas negativas de las cadenas laterales, en particular de los grupos fosfato, representan los sitios de enlaces. Sin embargo, estos fosfopéptidos muestran marcadas diferencias en la distribución de los grupos fosfato, así como en la fortaleza del enlace, tanto con el calcio, como con el hierro. La significativa diferencia en la actividad de enlace al calcio puede ser atribuida a la influencia de los residuos cercanos a los sitios fosforilados. Por ejemplo, el nonapéptido fosforilado derivado de la α_{s1} -caseína contiene una secuencia C-terminal hidrofóbica (41).

Un posible mecanismo por el cual un fosfopéptido forma complejos solubles con el calcio pudiera ser que el enlace al calcio involucre a los grupos fosfatos unidos a serinas, así como también a los grupos carboxílicos del ácido glutámico y la cola hidrofóbica apantalle a este complejo de otras interacciones y prevenga la formación de complejos insolubles.

Actividad antitrombótica

Entre los fenómenos de coagulación de la sangre y de la leche se ha encontrado similitud molecular. Por esta razón, Jollés *et al.* (26) estudiaron la existencia de secuencias inhibidoras de la agregación plaquetaria y la formación de trombos dentro de las proteínas lácteas. Una región análoga al fragmento 400 - 411 de la cadena g del fibrinógeno (secuencia implicada en la interacción del fibrinógeno con el receptor plaquetario) se encontró en la parte N-terminal del caseinomacropéptido bovino (región 106-169 de la k-caseína) (19).

Estos péptidos son conocidos como casoplatelinas e inhiben, tanto la agregación de las plaquetas activadas con ADP, como la unión de la cadena γ del fibrinógeno humano al receptor específico sobre la superficie de las plaquetas (27).

Los principales péptidos antitrombóticos derivados de la κ -caseína son la secuencia 106-116 (Met-Ala-Ile-Pro.Pro-Lys-Lys-Asn-Asp-Lys) y los fragmentos más pequeños 106-112, 112-116 y 113-116.

La evaluación de la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria de diversos péptidos derivados de la hidrólisis trípica del caseinomacropéptido y de péptidos sintéticos de esa región (106 - 116, 106 - 112 y 113 - 116) reveló que el fragmento 106 - 116 natural es el más activo. Sin embargo, los resultados alcanzados en el análisis *in vitro* de la actividad antiplaquetaria del pentapéptido 112-116 obtenido por hidrólisis trípica del caseinomacropéptido (32), reveló que dicho péptido es 200 veces más activo, que los péptidos 106-116 y 113-116 descritos por Jollés *et al.* (26).

Maubois *et al.* (39) reportaron que la actividad antiagregativa *in vitro* de los péptidos derivados del caseinomacropéptido es reforzada por la presencia de un residuo de lisina en la posición 112. Incluso, Kloczewiak *et al.* (29) señalaron la importancia de la lisina 406 del fibrinógeno γ en la unión de esta molécula con los receptores plaquetarios.

Por otro lado, se conoce que un fragmento de la lactoferrina, conocido como KRDS, también inhibe la agregación plaquetaria, aunque en menor cuantía que su análogo derivado del fibrinógeno (RGDS). A pesar de su similitud estructural y funcional se cree que ambos péptidos afectan la formación del trombo de manera diferente (56).

Actividad antimicrobiana

Los péptidos antimicrobianos se derivan, fundamentalmente, de una de las proteínas del suero, la lactoferrina. Esta proteína es una glicoproteína capaz

de unirse al hierro, presente en la mayoría de los fluidos de los mamíferos, incluyendo la leche. Se considera como uno de los componentes más importantes de defensa contra infecciones microbianas (13). Sin embargo, el mecanismo antimicrobiano de la lactoferrina es mucho más complejo que el simple enlace al hierro. Se ha reportado la existencia de una secuencia antimicrobiana cerca del extremo N-terminal de la lactoferrina en una región diferente a los sitios que participan en el enlace con el hierro (3). El fragmento 17-41 o lactoferricina, que tiene un puente disulfuro intramolecular, es obtenido *in vitro*, mediante la proteólisis con pepsina. Este péptido tiene mayores propiedades bactericidas que la lactoferrina intacta, lo cual sugiere que su menor tamaño puede facilitar el acceso a los sitios blanco sobre la superficie del microorganismo. Sin embargo, la obtención de este péptido *in vivo* mediante la digestión gastrointestinal es limitada en los niños (64).

Una característica distintiva de la lactoferrina es la presencia de clusters asimétricos de residuos básicos en una proporción relativamente elevada: ocho de cada 25 aminoácidos son básicos. La actividad antimicrobiana de la lactoferricina y sus análogos sintéticos parece estar relacionada con la carga neta positiva de los péptidos. Los clusters asimétricos de residuos básicos, también se han observado en varios péptidos, que muestran afinidad por las membranas biológicas. Estos péptidos catiónicos matan a los microorganismos sensibles al inducirles un incremento en la permeabilidad de la membrana celular. Por tanto, se asume que la lactoferricina posee su efecto antimicrobiano por un mecanismo similar (4). Se reportó recientemente que este péptido, además, es capaz de inhibir la infección por el virus del herpes simplex (25).

También, la caseidina, obtenida mediante la digestión con quimocina de la caseína a pH neutro, exhibe actividad *in vitro* contra *Saphylococcus*, *Sarcina*, *Bacillus subtilis*, *Diplococcus pneumoniae* y *Streptococcus pyogenes*. Por otra parte, la casocidina-I, un péptido catiónico derivado de la α_{s2} -caseína, inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Saphylococcus carnosus*. La isracidina, el segmento N-terminal de la α_{s2} -caseína B, protegió a los ratones de la infección con *Saphylococcus aureus* y *Candida albicans*. Este péptido también protegió a ovejas y vacas contra la mastitis cuando se les inyectó en la ubre a niveles comparables con el tratamiento con antibióticos (12).

Recientemente se identificó y purificó otro péptido con actividad antimicrobiana. El nuevo péptido es un

fragmento de la κ -caseína humana (residuos 63-117) e inhibe el crecimiento de bacterias gram-positivas, gram-negativas y levaduras (33).

La leche humana, específicamente el fragmento 184-210 de la β -caseína, también muestra un gran efecto de inhibición contra bacterias gram positivas y negativas, incluyendo especies de interés clínico tales como: *Enterococcus faecium*, *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Salmonella spp*, *Yersinia enterocolitica* y *Staphylococcus aureus* (49).

Asimismo, el fragmento 106-169 no glicosilado y fosforilado de la κ -caseína bovina, denominado kappacina, inhibe el crecimiento de los patógenos orales oportunistas *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*, así como de la *Escherichia coli*. Como resultado de su hidrólisis con la endoproteinasa Glu-C solo el péptido fosforilado (Ser 149) 138-158 presentó actividad. Este péptido y su análogo no fosforilado fueron sintetizados químicamente y se evaluó su actividad antimicrobiana. Solo el fragmento fosforilado inhibió el crecimiento de *Streptococcus mutans*, lo cual indica que la fosforilación es esencial para la actividad (37).

Efecto antioxidante

Se ha demostrado que muchos péptidos derivados de la leche poseen propiedades antioxidantes que previenen la oxidación de ácidos grasos esenciales. Muchos investigadores han centrado su atención en el estudio de estas propiedades en las caseínas y péptidos derivados. Rival *et al.* (55) concluyeron que estos compuestos son capaces de inhibir la peroxidación lipídica, tanto enzimática como no enzimática, lo cual sugiere que constituyen blancos preferenciales para los radicales libres intermediarios. Además, evidencias indirectas sugieren que la captura de los radicales libres por proteínas/péptidos está acompañada por la oxidación de estas moléculas de acuerdo a un mecanismo de secuencia-específico. Por su parte, Cervato *et al.* (9) demostraron, en un estudio con modelos liposomales, que las subunidades de la caseína (α , β y κ) son capaces de inhibir la peroxidación lipídica inducida por hierro del ácido araquidónico insertado en la membrana de los liposomas. Los mecanismos de acción antioxidante son complejos, pero los mayores efectos se obtienen modificando el equilibrio Fe^{2+}/Fe^{3+} , de hecho las caseínas parecen favorecer la autooxidación del hierro y así inhiben la peroxidación lipídica.

También los caseinofosfopéptidos son efectivos inhibidores de la peroxidación, aunque en menor cuan-

tía que los hidrolizados de caseína con igual contenido de fósforo. Así, las propiedades antioxidantes no deben ser atribuidas únicamente a las propiedades quelantes de los residuos de fosfoserina, sino también a la captura de radicales libres (16).

Sin embargo, en la leche estas propiedades no son exclusivas de las caseínas y sus derivados. Existen evidencias de que la lactoferrina también se comporta como un antioxidante. En un estudio reciente con eritrocitos humanos, esta proteína láctea influyó sobre el contenido y actividad de antioxidantes intracelulares, principalmente del glutatión reducido. Además disminuyó la generación de productos reactivos del ácido tiobarbitúrico y la hemólisis, tanto en la ausencia de iones metálicos en el medio, como en su presencia. Estos hechos indican que, aunque la lactoferrina es capaz de enlazar iones metálicos y así bloquear su participación catalítica en daños oxidativos a la membrana, sus propiedades antioxidantes se deben probablemente a su efecto estimulador de la glucólisis, lo cual conduce a un incremento en la formación del ATP necesario en el mantenimiento del gradiente iónico, el potencial de membrana y la morfología del eritrocito (38).

Recientemente se encontró que el tetrapéptido correspondiente a los residuos 39-42 de la lactoferrina humana inhibe los efectos tóxicos de los radicales libres, mediante el incremento de los niveles de antioxidantes en un modelo en ratas de artritis inducida (30).

Asimismo, se plantea que la adición de un residuo de Leucina o Prolina al residuo N-terminal del dipéptido His-His, refuerza dicha actividad y facilita el sinergismo con antioxidantes no peptídicos (28).

Aplicaciones dietéticas y farmacéuticas

Aun cuando muchos péptidos no son liberados bajo condiciones fisiológicas *in vivo*, ellos podrían ser producidos comercialmente y usados como nutracéuticos. Un nutracéutico es cualquier alimento o parte de él que proporciona beneficios para la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de una enfermedad (15). Sin embargo, es conveniente hacer una distinción entre los nutracéuticos para el tratamiento de enfermedades, donde se necesitan compuestos farmacológicamente activos y aquellos que mejoran la salud y actúan como preventivos. Con frecuencia, la mayoría de estos últimos se presentan como ingredientes de alimentos funcionales.

Un alimento es llamado funcional cuando ha sido satisfactoriamente demostrado que afecta benéfica-

mente alguna actividad o función fisiológica, pero que va más allá de un efecto nutricional (60).

Los alimentos funcionales no deben confundirse con productos médicos alimenticios que son designados para suplir la carencia de nutrientes o para el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades relacionadas con la dieta.

Durante los últimos años se han propuesto interesantes aplicaciones para los péptidos derivados de la caseína, de las cuales las más promisorias son las siguientes (46).

- Suplementación de la dieta con los péptidos bioactivos sintéticos adecuados.
- Producción de los péptidos bioactivos durante el procesamiento de los alimentos o mediante el uso de microorganismos genéticamente transformados.
- Incorporación de genes codificantes de los péptidos bioactivos o introducción de nuevos sitios susceptibles a proteinasas en la molécula precursora mediante técnicas de ingeniería genética. Este mismo procedimiento podría emplearse para eliminar las actividades biológicas no deseadas.
- Administración de péptidos como preparaciones farmacéuticas.

Ya se han obtenido preparaciones de fosfopéptidos, mediante cromatografía de intercambio iónico a partir de hidrolizados enzimáticos (31) o mediante la agregación con iones bivalentes de los péptidos hidrolizados y posterior ultrafiltración (7). Las mezclas de fosfopéptidos se comercializan como polvo en forma de spray. Gracias a su posible aplicación como transportadores de minerales se ha propuesto su uso en alimentos tales como pan, cake, bebidas y en aplicaciones farmacéuticas en forma de tabletas, pastas y rellenos dentales (54).

Las β -casomorfina también se han producido mediante técnicas de ingeniería genética. Estas casomorfina recombinantes pudieran utilizarse en el mejoramiento de aspectos relacionados con el desarrollo del animal, tales como la ganancia en peso y la producción de leche. Se han logrado expresar también péptidos antihipertensivos derivados de la leche en *E. coli* (35). Por otra parte se ha intentado en diversas ocasiones la obtención de secuencias peptídicas modificadas químicamente con el objetivo de encontrar péptidos más activos y/o mayor duración de la acción. Se obtuvo un considerable incremento de la actividad analgésica y antidiarreica, a través de la sustitu-

ción de L-aminoácidos con D-aminoácidos y la amidación del extremo C-terminal. La morfeceptina β -casomorfina-4-amida es un ejemplo de péptido modificado químicamente. Modificaciones como estas no solo influyen en la afinidad de los análogos resultantes, sino también alteran su farmacocinética, en particular su inactivación mediante enzimas proteolíticas (41).

Los hidrolizados trépticos de caseína, que contienen péptidos inhibidores de la ECA también son útiles como ingredientes de alimentos funcionales para prevenir la hipertensión (20). Esto se basa en estudios realizados con voluntarios normotensivos y ligeramente hipertensivos, quienes ingirieron 10 g de hidrolizados trépticos de caseína dos veces al día durante cuatro semanas (59).

Recientemente Bordenave *et al.* (6) obtuvieron la α -lactofina de leche de cabra mediante la hidrólisis continua con pepsina en un reactor de ultrafiltración.

De forma similar se obtuvieron péptidos antihipertensivos utilizando un modelo semicontinuo de digestión gastrointestinal *in vitro* (65).

Los dipéptidos y tripéptidos correspondientes a las secuencias inmunomoduladoras, también se han encontrado como componentes activos en un extracto de leucocitos hidrolizados, proveniente de donantes normales, que se usaron en un ensayo para inhibir el desarrollo de infecciones en pacientes presidosos (23). El tratamiento dos veces por semana a 93 pacientes que padecen un complejo relacionado con el SIDA mostró una tendencia significativamente baja al progreso hacia el estado terminal o al SIDA.

Drouet *et al.* (17) propusieron la utilización fragmentos de la κ -caseína en la fabricación de un medicamento para la prevención de la trombosis.

CONCLUSIONES

En resumen, las proteínas lácteas contienen numerosas secuencias peptídicas, que afectan diferentes funciones fisiológicas y modulan muchos procesos reguladores. Fundamentalmente, su acción incluye respuestas conductuales, gastrointestinales, hormonales, inmunológicas, neurológicas y nutritivas.

Ya se han establecido procesos a gran escala para recobrar las moléculas biológicamente activas presentes en el suero que se obtiene como residuo durante la fabricación de quesos. Las caseínas son obtenidas, igualmente, a escala industrial para la elaboración de productos lácteos. Todo esto hace económicamente

posible la recuperación de estas fracciones proteicas y la generación de péptidos activos a partir de ellas, los cuales pueden utilizarse como suplementos dietéticos, preservantes naturales (antimicrobianos), nutracéuticos, así como en preparaciones farmacéuticas. En el caso particular de Cuba, este campo de investigación abre nuevas perspectivas para la revaloración de importantes volúmenes de suero de quesería, que son desechados prácticamente en su totalidad, lo cual podría tener gran significado para la industria alimenticia y la salud pública.

REFERENCIAS

1. Aimutis, W.R. (2004): Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J Nutr.* 134(4): 989-95.
2. Baró, L.; Jiménez, J.; Martínez-Férez, A. y Bouza, J.J. (2001): Bioactive Milk Peptides and Proteins. *Ars. Pharmaceutica.* 42(3-4): 135-145.
3. Bellamy, W.; Takase, M.; Yamauchi, K.; Kawase, K.; Shimamura, S. y Tomita, M. (1992): Identification of bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys. Acta.* 1121: 130-136.
3. Bellamy, W.; Wakabayashi, H.; Takase, M.; Kawase, K.; Shimamura, S. y Tomota, M. (1993): Role of cell-binding in the bacterial mechanism of lactoferricin B. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 478-484.
4. Berrocal, R.; Chanton, S.; Juillerat, M.A.; Pavillard, B.; Scherz, J.C. y Jost, R. (1989): Tryptic phosphopeptides from whole casein: II. Physicochemical properties related to the solubilization of calcium. *J. Dairy Sci.* 56: 335-341.
5. Bordenave, S.; Sannier, F.; Ricart, G. y Piot, J.M. (1999): Continuous hydrolysis of goat whey in an ultrafiltration reactor: generation of alpha-lactoferrin. *Prep. Biochem. Biotechnol.* 29(2): 189-202.
6. Brule, G.; Roger, L.; Fauquant, J. y Piot, M. (1982): Phosphopeptides from casein-based material. US Pat. Appl. US 4 358 465.
7. Caccavo, D.; Pellegrino, N.M.; Altamura, M.; Rigon, A.; Amati, L.; Amoroso, A. y Jirillo, E.J. (2002): Antimicrobial and immunoregulatory functions of lactoferrin and its potential therapeutic application. *Endotoxin Res.* 8(6): 403-417.

8. Cervato, G.; Cazzola, R. y Cestaro, B. (1999): Studies on the antioxidant activity of milk caseins. *Int J. Food Sci Nutr.* 50(4): 291-6.
9. Chang, K.J.; Killian, A.; Hazum, E. y Cuatrecasas, P. (1981): Morphiceptin: a potent and specific agonist for morphine (μ) receptor. *Science.* 212: 75-77.
10. Chiba, H.; Tani, F. y Yoshikawa, M. (1989): Opioid antagonist peptides derived from κ -casein. *J. Dairy Res.* 56: 363-366.
11. Clare, D.A. y Swaisgood, H.E. (2000): Bioactive milk protein: a prospectus. *J. Dairy Sci.* 83: 1187-1195.
12. Clare, D.A.; Catignani, G.L. y Swaisgood, H.E. (2003): Biodefense properties of milk: the role of antimicrobial proteins and peptides. *Curr Pharm Des.* 16: 1239-55.
13. Coste, M.; Rochet, V.; Léonil, J.; Mollé, D.; Bouhallab, S. y Tome, D. (1992): Identification of C-terminal peptides of bovine b-casein that enhance proliferation of rat lymphocytes. *Immunol. Lett.* 33: 41-46.
14. DeFelice, S.L. (1995): The nutritional revolution: its impact on food industry R&D. *Trends Food Sci. Technol.* 6: 59-61.
15. Díaz, M.; Dunn, C.M.; McClements, D.J. y Decker, E.A. (2003): Use of caseinophosphopeptides as natural antioxidants in oil-in-water emulsions. *J. Agric Food Chem.* 51(8): 2365-70.
16. Drouet, L.; Bal Dit Sollier, C.; Mazoyer, E.; Lévy-Toledano, S.; Jollés, P. y Fiat, A.M. (1990): Utilisation du caséinoglycopeptide κ pour la fabrication d'une composition, notamment d'un médicament, pour la prévention et le traitement des thromboses. *Eur. Pat. Appl.* EP 0 397 571 A1.
17. Faith, R.E.; Liang H.J.; Murgo, A.J. y Plotnikoff, N.P. (1984): Neuroimmunomodulation with enkephalins: enhancement of human natural killer (NK) cell activity *in vitro*. *Clin. Immunol. Immunophatol.* 32: 412-418.
18. Fiat, A.M.; Levy-Toledano, S.; Caen, S.P. y Jollés, P. (1989): Biologically active peptides of casein and lactotransferrin implicated in platelet function. *J. Dairy Res.* 56: 351-355.
19. FitzGerald, R.J.; Murray, B.A. y Walsh, D.J. (2004): Hypotensive peptides from milk proteins. *J. Nutr.* 134(4): 980-8.
20. Fuglsang, A.; Nilsson, D. y Nyborg, N.C. (2003): Characterization of new milk-derived inhibitors of angiotensin converting enzyme *in vitro* and *in vivo*. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 18(5): 407-12.
21. Gill, H.S.; Doull, F.; Rutherford, K.J. y Cross, M.L.I (2001): Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Br. J. Nutr.* 84 Suppl 1: 111-7
22. Hadden, J.W. (1991): Immunotherapy of human immunodeficiency virus infection. *Trends Pharmaceutical Sci.* 12: 107-111.
23. Janecka, A.; Fichna, J. y Janecki, T. (2004): Opioid receptors and their ligands. *Curr. Top. Med. Chem.* 4(1): 1-17.
24. Jenssen, H.; Andersen, J.H.; Uhlin-Hansen, L.; Gutteberg, T.J. y Rekdal, O. (2004): Anti-HSV activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Res.* 61(2): 101-9.
25. Jollés, P.; Levy-Toledano, S.; Fiat, A.M.; Soria, C.; Gillessen, D.; Thomaidis, A.; Dunn, F.W. y Caen, J.B. (1986): Analogy between fibrinogen and casein. *Eur. J. Biochem.* 158: 379-384.
26. Kayser, H. y Meisel, H. (1996): Stimulation of human peripheral blood lymphocytes by bioactive peptides derived from bovine milk proteins. *FEBS Lett.* 383: 18-20.
27. Kitts, D.D. y Weiler, K. (2003): Bioactive Proteins and Peptides from Food Sources. Applications of Bioprocesses used in Isolation and Recovery. *Curr Pharm Des.* 9(16): 1309-23.
28. Kloczewiak, M.; Timmons, S.; Lukas, T.J. y Hawiger, J. (1984): Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to carboxy-terminal fragment on the g-chain. *Biochem.* 23: 1767-1774.
29. Kumar, D.A.; Manikandan, P.; Sumitra, M.; Raju, K.V.; Gayathri, C.; Arutselvan, N. y Puvanakrishnan, R. (2002): A novel peptide derivative exhibits anti inflammatory and

- antioxidant activity in adjuvant induced arthritis in rats. *Mol Cell Biochem.* 229(1-2): 9-17.
30. Kunst, A. (1992): Process to isolate phosphopeptides. Eur. Pat. Appl. EP 0 467 199.
 31. Leónil, J. y Mollé, D. (1990): Liberation of tryptic fragments of caseinomacropeptide of bovine κ -casein in platelet function. *Biochem. J.* 271: 247-272.
 32. Liepke, C.; Zucht, H.D.; Forssmann, W.G. y Standker, L. (2001): Purification of novel peptide antibiotics from human milk. *J. Chromatogr. B. Biomed Sci. Appl.* 752(2): 369-77.
 33. Loukas, S.; Varoucha, D.; Zioudrou, C.; Streaty, R. A. y Klee, W. A. (1983): Opioid activities and structures of α -casein-derived exorphins. *Biochemistry.* 22:4567-4576.
 34. Lv, G.S.; Huo, G.C. y Fu, X.Y. (2003): Expression of milk-derived antihypertensive peptide in *Escherichia coli*. *J. Dairy Sci.* 86(6): 1927-31.
 35. Maes, W.; Van Camp, J.; Vermeirssen, V.; Hemeryck, M.; Ketelslegers, J.M.; Schrezenmeir, J.; Van Oostveldt, P. y Huyghebaert, A. (2004): Influence of the lactokinin Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg (ALPMHIR) on the release of endothelin-1 by endothelial cells. *Regul. Pept.* 118(1-2): 105-9.
 36. Malkoski, M.; Dashper, S.G.; O'Brien-Simpson, N.M.; Talbo, G.H.; Macris, M.; Cross, K.J. y Reynolds, E.C. (2001): Kappacin, a novel antibacterial peptide from bovine milk. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45(8): 2309-2315
 37. Maneva, A.; Taleva, B.; Maneva, L. (2003): Lactoferrin-protector against oxidative stress and regulator of glycolysis in human erythrocytes. *Z. Naturforsch [C]*. 58(3-4): 256-62.
 38. Maubois, J.L. y Leónil, J. (1989): Peptides du lait à activité biologique. *Le Lait.* 69: 245-269.
 39. Meisel, H. (1993): Casokinins as bioactive peptides in the primary structure of casein. In: *Food Proteins-Structure Functionality*. VCH, Weinheim, New York 67-75.
 40. Meisel, H. (1997): Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications. *Livestock Prod. Sci.* 50: 125-138.
 41. Meisel, H. (2001): Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Aust. J. Dairy Technol* 56(2): 83-92.
 42. Meisel, H. y Bockelmann, B. (1999): Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropho-fuctional properties. *Antonie van Leeuwenhoek.* 76: 207-215.
 43. Meisel, H. y FitzGerald, R.J. (2003): Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des.* 9(16): 1289-95.
 44. Meisel, H. y Günther, S. (1998): Food proteins as precursors of peptides modulating human cell activity. *Nahrung.* 42: 175-176.
 45. Meisel, H. y Schlimme, E. (1990): Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends Food Sci. Technol.* Aug: 41-43.
 46. Meisel, H. y Schlimme, E. (1994): Inhibitors of angiotensin-converting-enzyme derived from bovine casein (casokinins). En *β -casomorphins and related peptides: Recent developments*. VCH, Weinheim. 27-33.
 47. Migliore-Samour, D.; Floc'h, F. y Jollés, P. (1989): Biologically active casein peptides implicated in immunomodulation. *J. Dairy Res.* 56: 357-362.
 48. Minervini, F.; Algaron, F.; Rizzello, C.G.; Fox, P.F.; Monnet, V. y Gobetti, M. (2003): Angiotensin I-converting-enzyme-inhibitory and antibacterial peptides from *Lactobacillus helveticus* PR4 proteinase-hydrolyzed caseins of milk from six species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69(9): 5297-305.
 49. Parker, F.; Migliore-Samour, D.; Floc'h, F.; Zerial, A.; Werner, G.H.; Jollés, J.; Casaretto, M.; Zahn, H. y Jollés, P. (1984): Immunostimulating hexapeptide from human casein: amino acid sequence, synthesis and biological properties. *Eur. J. Biochem.* 145: 677-682.
 50. Pfeuffer, M. y Schrezenmeir, J. (2000): Bioactive substance in milk with properties decreasing risk of cardiovascular diseases. *British J. Nutr.* 84(1): S155-S159.
 51. Pihlanto, A. (2001): Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 347-356.

52. Prioult, G.; Pecquet, S. y Fliss, I. (2004): Stimulation of interleukin-10 production by acidic beta-lactoglobulin-derived peptides hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 peptidases. *Clin Diagn Lab Immunol.* 11(2): 266-71.
53. Reynolds, E. (1987): Phosphopeptides. Int. Pat. Appl. WO 87/07615 A1.
54. Rival, S. G.; Boeriu, C. G. y Wichers, H. J. (2001): Caseins and casein hydrolysates. 2. Antioxidative properties and relevance to lipoxygenase inhibition. *J. Agric. Food Chem.* 49(1): 295-302.
55. Rutherford, K.J. y Gill, H.S. (2000): Peptides affecting coagulation. *Br. J. Nutr.* 84(1): 99-102.
56. Schlimme, E. y Meisel, H. (1995): Bioactive peptides derived from milk proteins. Structural, physiological and analytical aspects. *Nahrung Food.* 39: 1-20.
57. Scholz-Ahrens, K.E. y Schrezenmeir, J. (2000): Effects of bioactive substances in milk on mineral and trace element metabolism with special reference to casein phosphopeptides. *Br. J. Nutr.* 84(1): 147-153.
58. Sekiya, S.; Kobayashi, Y.; Kita, E.; Imamua, Y. y Toyama, S. (1992): Antihypertensive effects of tryptic hydrolysates of casein on normotensive volunteers. *J. Jpn. Nutr. Food. Sci.* 45: 513-517.
59. Silva, E.R. y Verdalet, I. (2003): Review: functional foods and ingredients derived from milk. *Arch. Latinoam. Nutr.* 53(4): 333-47.
60. ipola, M.; Finckenberg, P.; Vapaatalo, H.; Pihlanto-Leppala, A.; Coronen, H.; Korpela, R. y Nurminen, M. L. (2002): Alpha-lactorphin and beta-lactorphin improve arterial function in spontaneously hypertensive rats. *Life Sci.* 71(11):1 245-53.
61. Teschemacher H. (2003): Opioid receptor ligands derived from food proteins. *Curr Pharm Des.* 9(16): 1331-44.
62. Tomita, M.; Wakabayashi, H.; Yamauchi, K; Teraguchi, S. y Hayasawa, H. (2002): Bovine lactoferrin and lactoferricin derived from milk: production and applications. *Biochem. Cell Biol.* 80(1): 109-112.
63. van Hooijdonk, A.C.M.; Kussendrager, K.D. y Steijns, J.M. (2000): *In vivo* antimicrobial and antiviral activity of components in bovine milk and colostrum involved in non-specific defense. *British J. Nutr.* 84(1): S127-S134.
64. Vermeirssen, V.; Van Camp, J.; Devos, L. y Verstraete W. (2003): Release of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity during *in vitro* gastrointestinal digestion: from batch experiment to semicontinuous model. *J. Agric. Food Chem.* 51(19): 5680-7.
65. Wakabayashi, H.; Takase, M. y Tomita, M. (2003): Lactoferricin derived from milk protein lactoferrin. *Curr. Pharm.* 9(16): 1277-87.
66. Yamamoto, N. y Takano, T. (1999): Antihypertensive peptides derived from milk proteins. *Nahrung.* 43(3): 159-164.
67. Yamamoto, N.; Ejiri, M. y Mizuno, S. (2003): Biogenic peptides and their potential use. *Curr. Pharm. Des.* 9(16): 1345-55.
68. Yoshikawa, M.; Tani, F. y Chiba, H. (1988): Structure-activity relationship and antagonist peptides derived from milk proteins. In: *Peptide chemistry*. Protein Research Foundation, Osaka. 473-476.

(Recibido 22-7-2004; Aceptado 14-10-2004)