

Capítulo 42

MODULACIÓN NUTRACÉUTICA DEL GLUTATIÓN CON PROTEÍNAS AISLADAS DEL SUERO DE LECHE NATURAL HUMANIZADA, IMMUNOCALTM Y SU APLICACIÓN EN CÁNCER Y SIDA

Traducción y comentarios:

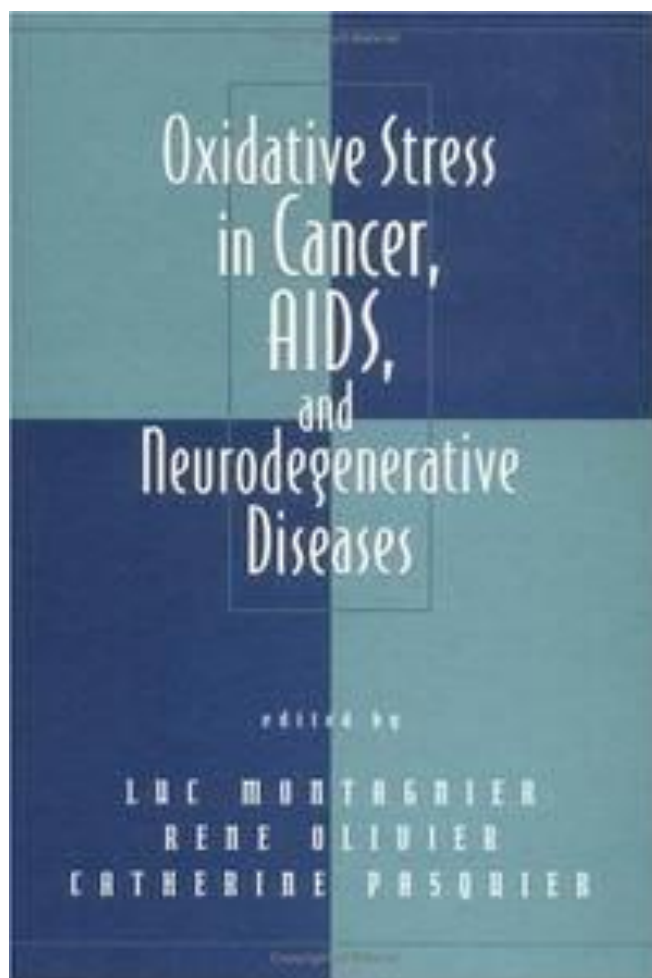
Dr. Germán Montaña

Supervisión:

Dr. Ricardo García Pelayo

Dr. Carlos Mendoza Díaz

CDMX, marzo, 2018



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

Capítulo 42

del libro:

ESTRÉS OXIDATIVO EN CÁNCER SIDA Y ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

(Oxidative Stress in Cancer, AIDS, and Neurodegenerative Diseases)

Autores del Capítulo 42:

Sylvain Baruchel and Ginette Viau

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

René Olivier

Instituto Pasteur en Paris, France

Gustavo Bounous

Montreal General Hospital, Montreal, Quebec, Canada

Mark A. Wainberg

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

CAPÍTULO 42.

MODULACIÓN NUTRACÉUTICA DEL GLUTATIÓN CON PROTEÍNAS AISLADAS DEL SUERO DE LECHE NATURAL HUMANIZADA, IMMUNOCAL™ Y SU APLICACIÓN EN CÁNCER Y SIDA

LA INMUNOMODULACIÓN NUTRICIONAL Y SU RELACIÓN CON LA SÍNTESIS DEL GLUTATIÓN

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

En 1981 se descubrió que los ratones normales alimentados con un concentrado de proteínas del suero de la leche (especialmente preparado bajo condiciones en las cuales no se desnaturalizan las proteínas *n. del t.*) mostraron un marcado incremento en la respuesta humoral de la inmunidad ante un antígeno dependiente de los linfocitos T colaboradores (T *helper*)¹. En los años siguientes, numerosos experimentos confirmaron la persistencia de este resultado²⁻¹⁰. Durante un período de 12 años y en base a estos resultados, un producto consistente en un concentrado de proteínas aisladas del suero de la leche bovina natural tipo humanizada (HNMPI) llamado IMMUNOCAL™ se desarrolló por Immunotec Research Corporation Ltd., en Montreal, Quebec, Canadá).

Esta propiedad se encontró relacionada, en parte, con una mayor producción del glutatión (L- α -glutamilcisteinilglicina) (GSH) en el bazo durante la expansión del antígeno clonal que requiere de la fuente de oxígeno en los linfocitos de los animales alimentados con este producto bioactivo HNMPI⁹. Los niveles adecuados del GSH son

necesarios para la proliferación de los linfocitos en el desarrollo de la respuesta inmune^{11,12}. La elevación moderada pero sostenida del GSH celular, también se encontró en el hígado y en el corazón de los ratones saludables y de los ratones viejos alimentados durante un período prolongado con el HNMPi. Además, el HNMPi aumentó notablemente la esperanza de vida en comparación con los animales del grupo control alimentados con dietas nutricionalmente equivalentes¹³.

El glutatión es de gran importancia en la *actividad antioxidante celular* a la que el Dr. Meister llamó "el Sistema Antioxidante del Glutatión" porque participa directamente en la destrucción de las Especies Reactivas de Oxígeno (**ROS**) y también porque mantiene en forma reducida al ascorbato (vitamina C) y al α -tocoferol (vitamina E), las cuales también ejercen un efecto antioxidante¹⁴.

LA FUNCIÓN DEL HNMPi COMO SISTEMA DE ENTREGA DE CISTEÍNA

¿Qué ingrediente hacen que el IMMUNOCAL™ sea un "sistema eficaz de entrega de cisteína"?

La disponibilidad sistémica del GSH oral es insignificante en el hombre¹⁵ y no hay evidencia del transporte del GSH en las células¹⁶. Por lo tanto, tiene que ser sintetizado intracelularmente. Ésto se produce en dos pasos: (a) la síntesis de la molécula glutamilcisteína y (b) la síntesis del glutatión. A pesar de que la afluencia de la cisteína, el glutamato y la glicina podría resultar algo limitados en situaciones especiales. Numerosas observaciones han demostrado que el transporte de la cisteína (o cistina, que por lo general se reduce rápidamente para formar cisteína y así poder entrar a la célula), que tiende a influir en la tasa de limitación de los procesos en la síntesis del GSH, mientras que la cisteína libre no representa un sistema de entrega idóneo¹⁷, ya que resulta tóxica y se oxida espontáneamente.

La cisteína presente en la forma de disulfuro de cistina, es liberada durante la digestión (*de las proteínas*) en el tracto gastrointestinal; es un aminoácido más estable que los aminoácidos libres. La síntesis del GSH es sometida a la inhibición dada por la retroalimentación negativa del producto final: el GSH. El enlace

disulfuro (*de la cistina*) es resistente a la pepsina y a la tripsina, pero se puede dividir por el calor y el estrés mecánico⁹. La cistina representa aproximadamente el 90% de la masa molecular de la cisteína en el plasma sanguíneo, mientras que la cisteína reducida se presenta solamente en una concentración muy baja¹⁸.

En un estudio comparativo, se encontró que el suero de la leche comercial concentra y exhibe mucho menos bioactividad, incluyendo una menor actividad precursora del GSH, (la leche n.t.) contiene aproximadamente la mitad de la albúmina sérica⁹ y 4 veces menos lactoferrina que el HNMPi, expresado (el contenido) como un porcentaje del total de las proteínas del suero de leche. Immunocal es producido en un proceso patentado muy cuidado, que permite la preservación de las proteínas más termolábiles en su conformación natural. (*No están desnaturalizadas n. de t.*)

En la albúmina del suero (lácteo), hay 17 residuos de cistina* por molécula de 66 kDa* y 6 dipéptidos Glu, Cys¹⁹; en la lactoferrina hay 17 por molécula de 77 kDa y 4 dipéptidos Glu-Cys²⁰; y en la α -lactoalbúmina hay 4 cistinas en una molécula de 14.000 kDa¹⁹.

*kDa significa kiloDaltons (que es una medida de peso molecular). (n. del T.)

*La **cistina** es un dímero formado por dos cisteínas unidas por sus grupos funcionales tiol a través de un puente disulfuro (dos átomos de azufre). (n. del T.)

*El dipéptido Glu, Cys, está formado por la unión de los aminoácidos glutamato y cisteína, que tienen la propiedad de poder atravesar la membrana celular y este dipéptido es precursor de la formación del GSH, para cuya síntesis solamente hay que agregar finalmente otro aminoácido que es la glicina.

Por otro lado, la β -lactoglobulina tiene sólo 2 cistinas en una molécula de 18,400 kDa¹⁹, la IgG1, la inmunoglobulina predominante en el suero de la leche de vaca tiene sólo 4 puentes de disulfuro en una molécula de 166.000 kDa (Tabla 1). Además, Meister y sus colaboradores¹⁶ demostraron que los precursores de la γ -glutamilcisteína (Glu-Cys) pueden entrar fácilmente en la célula para

sintetizar el GSH. Por lo tanto, es necesario destacar que las proteínas de la leche que son más lábiles (la albúmina del suero y la lactoferrina) son aquellas que contienen estos componentes peptídicos para sintetizar el prestigado GSH.

Tabla 1

	Masa molecular (kDa)	Residuos	Cisteína residuos por molécula	Cisteína (Cys) ₂ (disulfuro)	Glu-(Cys) ₂
β-Lactoglobulina	18,400	162	5	2	0
α-Lactoalbumina	14,200	125	8	4	0
Sero albúmina	66,000	582	35	17	6
Lactoferrina	77,000	708	40	17	4

Fuente: referencias 19,20

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

Esta propiedad recientemente descubierta del HNMPi resultó ser independiente de su valor nutricional, ya que otras proteínas de eficiencia nutricional similar no presentan esta función única¹⁻¹⁰. El concepto de que puede existir una actividad biológica específica, además de un efecto sistémico independiente del Immunocal por ser una buena fuente de proteínas se fundamenta en recientes ensayos *in vitro*²¹.

La provisión dietética de la cistina es particularmente relevante para el sistema inmune. La respuesta coordinada de los macrófagos y los linfocitos en la respuesta inmune mediada por las células T, se regula en parte, por la absorción de la cisteína por los macrófagos y

la liberación posterior de la cisteína reducida en el entorno local para su absorción por los linfocitos. Cuando los macrófagos que presentan los antígenos entran en contacto estrecho con las células T específicas de antígeno, ellas suministran a estas células cantidades adicionales de cisteína y con ello elevan su nivel del GSH intracelular¹⁸.

La validez de esta hipótesis se confirma por la demostración de que el incremento de la inmunidad y el incremento del GSH (datos no mostrados) como efecto del IMMUNOCALTM es abolido por la sulfoximina butionina, que inhibe a la enzima sintetasa de la γ -glutamilcisteína, que sería el primer paso en la síntesis del GSH¹⁷.

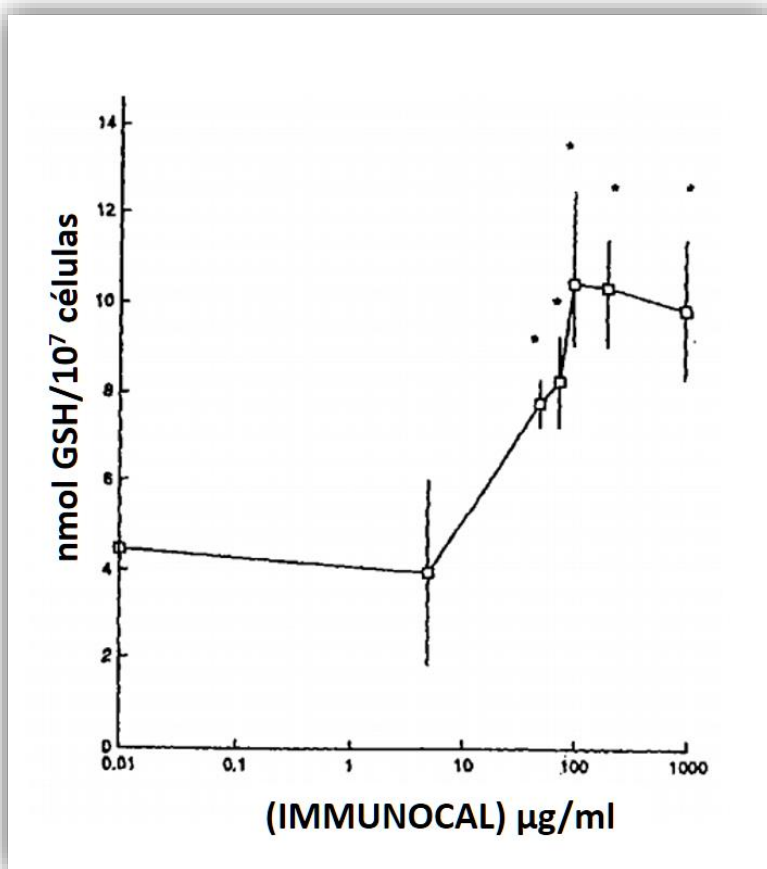


Figura 1. La incubación de **PBMC** durante 72 h en presencia de diversas cantidades de IMMUNOCALTM. Cada punto representa la media $\pm$ desviación estándar (SD) de 3 mediciones de glutatión intracelular. * $p < 0.05$.

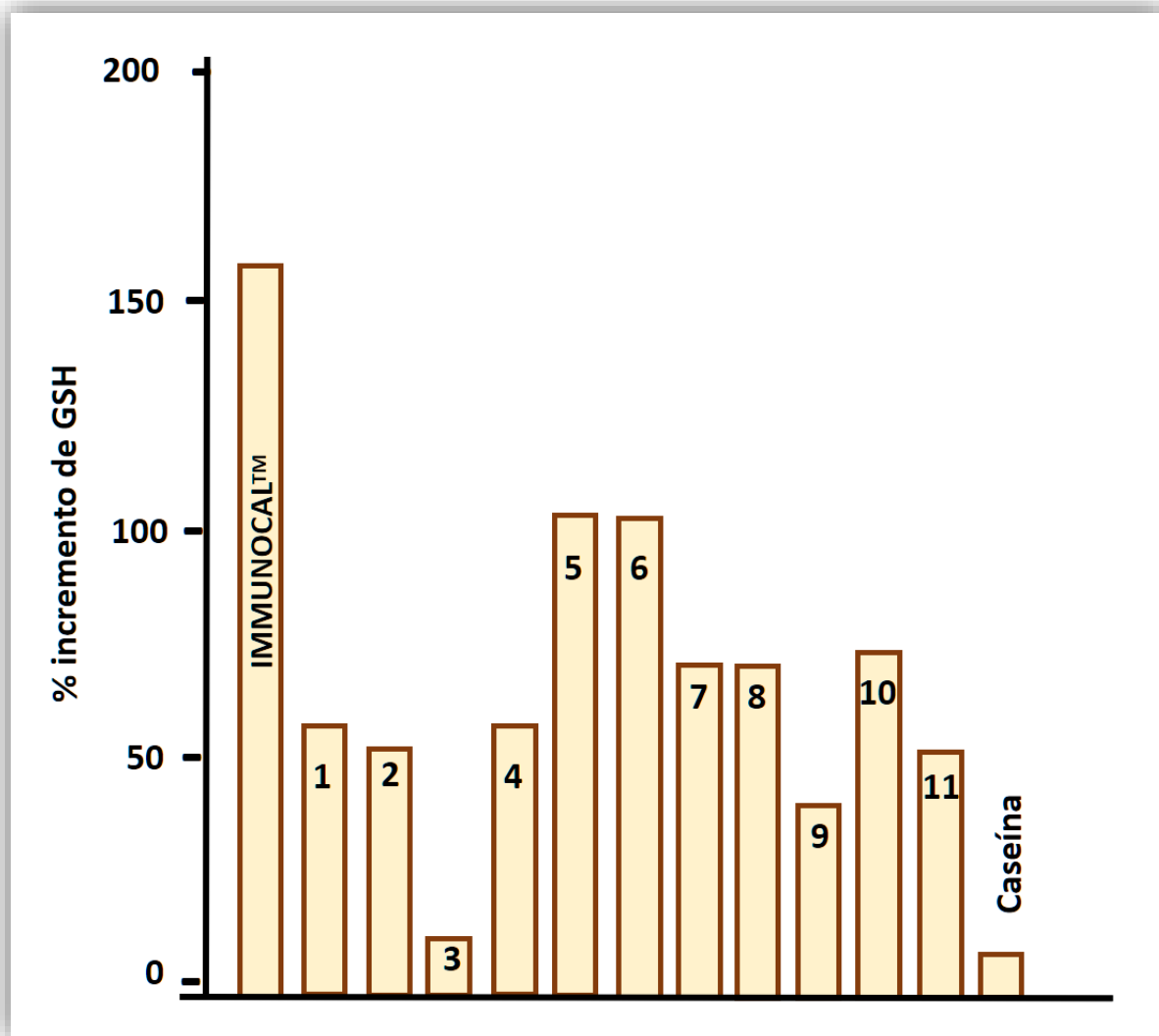


Figura 2. La incubación de PBMC durante 72 h en presencia de IMMUNOCAL™ y otros sueros de productos lácteos: Aumento porcentual del glutatión.

LA MODULACIÓN *IN VITRO* DEL GLUTATIÓN INTRACELULAR POR EL IMMUNOCAL™

Nosotros demostramos que los linfocitos humanos normales cultivados durante 3 días con HNMPi 100µg / ml exhiben un aumento en el contenido del GSH intracelular de 4.5 ± 0.4 a 10.5 ± 3.4 nmol / 10^6 células, $p < 0.01$ (Figura 1). Este aumento del GSH se correlaciona con un aumento en la proliferación celular medida por la incorporación de timidina (datos no mostrados). El aumento del

GSH es dependiente de la dosis y no se ha encontrado para la caseína o para cualquier otro concentrado de proteína de suero de leche disponible comercialmente (Figura 2).

Tabla 2. Presencia de los efectos citopáticos en células MT-4

IMMUNOCAL™ (µg/ml)	TCD ₅₀ /well ^a			
	2,000	200	20	2
0	+++	++	+	—
1	+++	++	+	—
10	++	+	+	—
100	—	—	—	—
500	—	—	—	—
1000	—	—	—	—

⊕ Presencia de efectos citopáticos; ausencia de efectos citopáticos*.

* Citopático: factor que se relaciona con, o produce daño a las células.

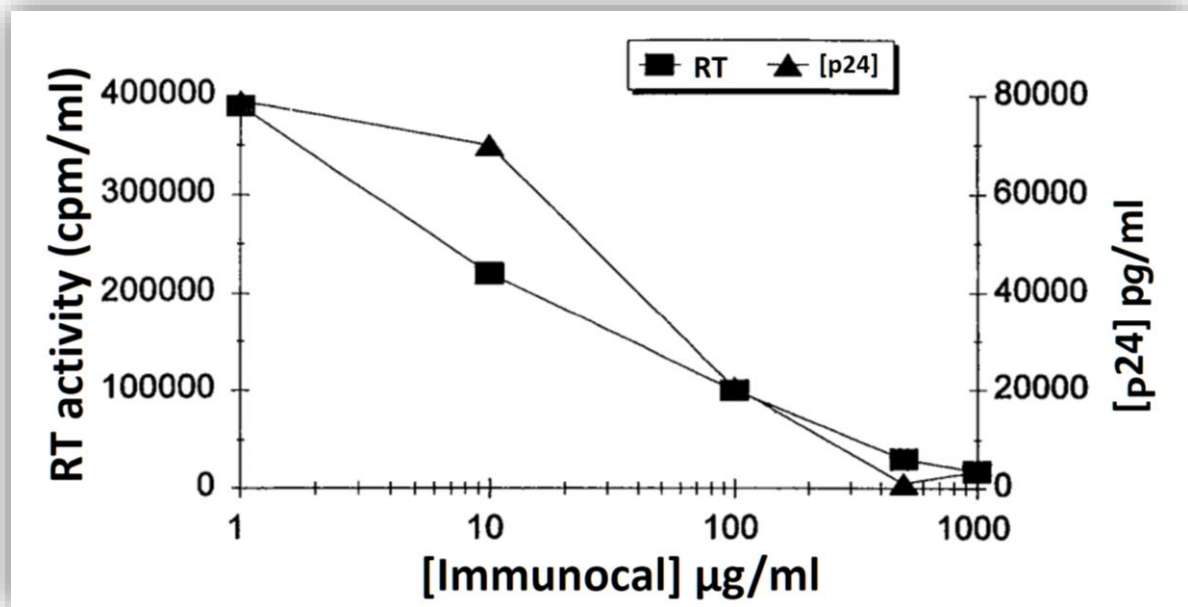


Figura 3. El IMMUNOCAL™ ha mostrado que inhiben la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

LA ACTIVIDAD DE HNMPi IN VITRO ANTI-VIH Y ANTIAPOPTÓTICA

Clínicamente, no hay evidencia directa de que la infección por el VIH se asocia con una deficiencia del GSH en las células mononucleares de la sangre periférica (PBMC)¹⁸. El agotamiento del GSH intracelular sugiere una asociación entre el estrés oxidativo y la infección por el 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- α y IL-6.

Durante este período de progresión, el glutatión se consume debido a un aumento del estrés oxidativo. El agotamiento del GSH, como una consecuencia del estrés oxidativo crónico, es parte del espectro de la infección por el VIH. El GSH tiene además un papel crucial en la función de los linfocitos y la supervivencia celular.

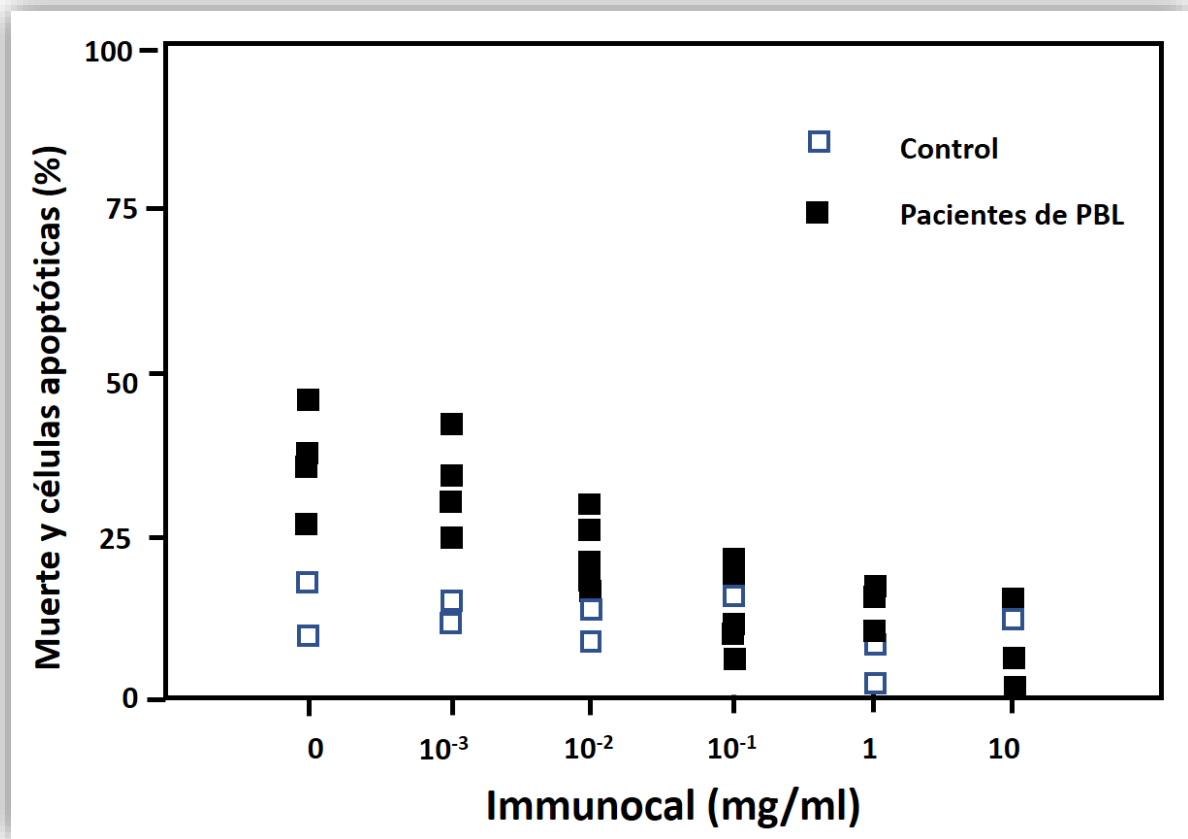


Figura 4. La inhibición de la muerte celular temprana por el IMMUNOCAL™

El 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 el HTL V-III B (Figura 3). El IMMUNOCAL™ también inhibe la formación del sincitio entre las células infectadas y las no infectadas. La inhibición de la formación del sincitio ocurrió con la misma concentración como en la inhibición de la replicación del VIH (Tabla 2). Esta inhibición viral no se asoció con ninguna citotoxicidad.

El IMMUNOCAL™, a través de su actividad de incrementar el GSH, reduce la apoptosis en las células infectadas por el VIH. La apoptosis se evaluó mediante citometría de flujo en las PBMC* de individuos infectados por el VIH (Dr. R. Olivier, del Departamento de SIDA y Retrovirus, Instituto Pasteur). Las PBMC infectadas por el VIH y cultivadas con concentraciones de IMMUNOCAL™ de 100 µg / ml o superior eran menos propensas a morir por la apoptosis que las células no tratadas: 15% ± 2.6% frente a 37% ± 2.4, $p < 0,001$ (Figura 4).

*La célula mononuclear de la sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cell PBMC) es cualquier célula blanca o leucocito de la sangre que tiene un núcleo redondo.

LA SUPLEMENTACIÓN DEL HNMPÍ 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 síndrome de desgaste. El objetivo principal fue evaluar el efecto de la suplementación oral con IMMUNOCAL™ con parámetros nutricionales y la concentración del GSH intracelular en linfocitos de la sangre de niños con SIDA y el síndrome de desgaste. Este fue un estudio piloto simple abierto de 6 meses de duración. El síndrome de desgaste y la pérdida de peso severa desde los 6 meses anteriores a la entrada al estudio fue un criterio absoluto para el ingreso al mismo.

El IMMUNOCAL™ se administró dos veces al día como un polvo diluido en agua. En algunos pacientes, el IMMUNOCAL™ se administró por sonda nasogástrica cuando fue necesario. La dosis inicial administrada se basa en el 20% del requerimiento total de proteínas al día y se incrementó en un 5% cada mes durante 4 meses hasta alcanzar el 35% de la ingesta total de proteínas al final del estudio. La duración total del estudio fue de 6 meses. Las circunferencias musculares, el peso, la talla, los pliegues cutáneos del músculo tríceps, la circunferencia media del brazo, los recuentos de CD4 /CD8, y las concentraciones del GSH en linfocitos periféricos (medido por el método de análisis espectrofotométrico) se midieron mensualmente. La ingesta de energía se evaluó mediante el uso de dos registros independientes de los alimentos de 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 el promedio 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: **Montreal Children's Hospital** (Dr. S. Baruchel) (Hospital de Niños de Montreal), **The Hospital For Sick Children Toronto** (El Hospital para Niños Enfermos de Toronto) (Dr. S. King), **Children's Hospital For Eastern Ontario** (el Hospital Infantil para el este de Ontario) (Dr. U. Allen) y **Centre Hospitalier Laval Quebec** (El Centro Hospitalario Laval de Quebec) (Dr. F. Boucher). De los 4 pacientes restantes, 2 dejaron de cumplir con este manejo nutricional después de 2 meses, mientras que los otros 2 fallecieron por la progresión de la enfermedad del SIDA dentro de los primeros 2 meses de iniciado 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 la ingesta del IMMUNOCAL™ transitoriamente por 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 la ingesta de nutrientes (RNI) por mes para todos los pacientes, no se encontró una correlación entre el aumento de peso y un aumento significativo en el porcentaje promedio del RNI, sugiriendo la reducción del catabolismo más bien que un efecto anabólico del IMMUNOCAL™. Seis de cada diez pacientes mostraron una mejoría en sus parámetros antropométricos como el pliegue tricipital o la circunferencia media del brazo independiente de un aumento en la ingesta de energía (Tabla 3).

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

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

Paciente Nº	Cambio de peso (%)		Cambios en la circunferencia media de brazo		Cambios en el pliegue tricipital (%)		PBMC GSH cambios (%)	
	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	NA	-1.6	NA

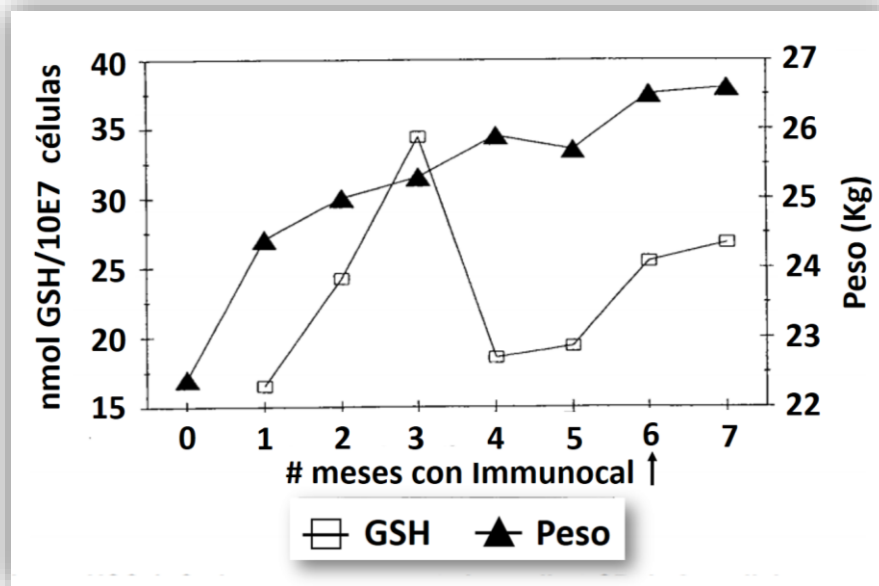


Figura 5. El glutatión intracelular en HSC 4. Cada punto representa la media $\pm$ SD (desviación estándar) de 3 mediciones. La flecha $\uparrow$ indica el final de estudio.

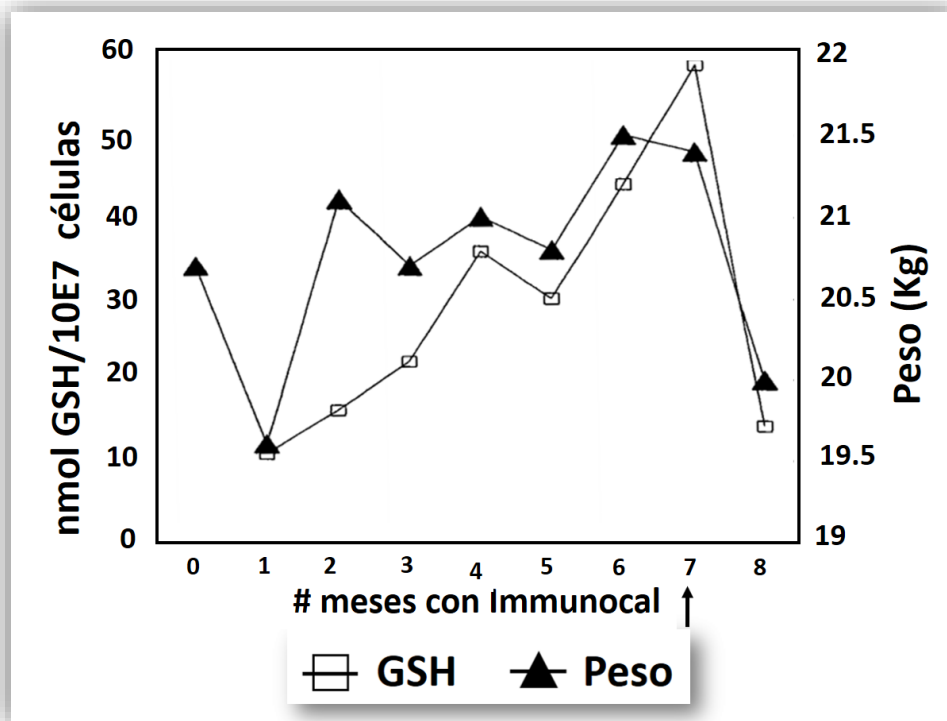


Figura 6. El glutatión intracelular en CHUL 1. Cada punto representa la media $\pm$ SD (desviación estándar) de tres mediciones. La flecha $\uparrow$ indica el final de estudio.

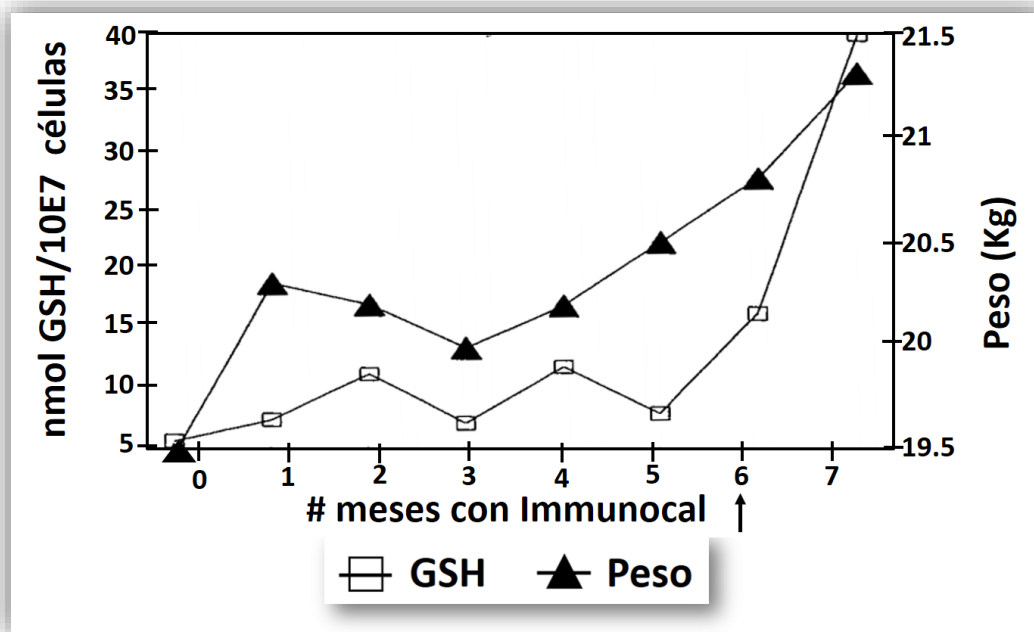


Figura 7. Glutación intracelular en MCH 3. Cada punto representa la media $\pm$ SD de tres mediciones. La flecha $\uparrow$ indica el final de estudio.

Los pacientes que no respondieron fueron aquellos que comenzaron con un nivel del GSH normal. Una correlación positiva fue encontrada entre el aumento de peso y el aumento del GSH (Figuras 5,6,7). No se encontraron cambios en términos del recuento de las células de los linfocitos CD4 en sangre, pero 2 pacientes mostraron un aumento en el porcentaje de sus células CD8 y 4 pacientes mostraron una tendencia hacia un aumento en el número de células NK*.

*NK: Las células asesinas naturales, o Natural Killer Cel, o células NK son un tipo de linfocitos citotóxicos críticos para el sistema inmune innato. El papel que desempeñan las células NK es análogo al de las células T citotóxicas en la respuesta inmune adaptativa de los vertebrados. Las células NK proporcionan respuestas rápidas a las células infectadas con virus, actúan aproximadamente 3 días después de la infección y responden ante la formación de tumores.

En conclusión, este estudio piloto demuestra que IMMUNOCAL™ es muy bien tolerado en niños con SIDA y con el síndrome de desgaste y se asocia con una mejoría del estado nutricional del paciente como se refleja en el peso y en los parámetros antropométricos. Por otra parte, la actividad del IMMUNOCAL™ promotora de la síntesis del GSH *in vivo* parece ser validada en 6 de cada 10 pacientes. Un estudio aleatorio multicéntrico internacional está actualmente en

marcha en Francia y Canadá, en pacientes adultos con SIDA y el síndrome de desgaste.

MODULACIÓN SELECTIVA DEL GLUTATIÓN DE LAS CÉLULAS DEL CÁNCER DE MAMA Y EL IMPACTO SOBRE EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS

La participación específica del GSH en el proceso carcinogénico es apoyada por el destacado papel desempeñado por este compuesto en la desintoxicación por conjugación de sustancias cancerígenas²⁶.

Hemos demostrado que la alimentación con GSH promovida por el HNMPi en los ratones tratados crónicamente con dimetilhidrazina (DMH) reduce significativamente el número y tamaño 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 del tipo de lesiones y en cuanto a las características de respuesta a los quimioterapéuticos se refiere²⁶. La alimentación con HNMPi parece ejercer un efecto inhibitorio no sólo en el inicio²⁷ del cáncer, sino también en la progresión de los tumores²⁸.

Recientemente, se confirmó un efecto inhibitorio directo de HNMPi en la replicación de células de cáncer humano^{21,29,30}. En otros estudios celulares de cáncer humano, el efecto inhibitorio se encontró relacionado con la albúmina, proteína componente del suero de leche³¹ y más recientemente con la lactoalbúmina³². La alimentación de ratones con la lactoferrina inhibió el crecimiento de tumores sólidos y, además, redujo la colonización del pulmón por melanomas³³. A diferencia de otras proteínas, la albúmina del suero exhibió un fuerte efecto anti-mutagénico en un ensayo *in vitro* utilizando células de hámster³⁴. Por tanto, es de destacar que con HNMPi hemos tenido éxito en la concentración de albúmina, α -lactoalbúmina, y lactoferrina del suero lácteo, las cuales contienen un número significativo de los precursores del GSH. Una posible explicación para estas propiedades recientemente descubiertas de la dieta con proteínas del suero de leche puede ser encontrado en los hallazgos recientes sobre el papel del GSH en la biología del tumor³⁵.

En los últimos años la búsqueda de las maneras de inhibir a las células cancerosas sin dañar a las células normales se ha basado en un vano esfuerzo por identificar los parámetros metabólicos en el que las células cancerosas están en desarmonía con las células normales. Una de las funciones más importantes podría ser la síntesis del GSH celular.

Pruebas experimentales recientes han revelado una respuesta interesante de las células tumorales y las células normales a los compuestos precursores para la síntesis del GSH. Se ha encontrado que los niveles celulares del GSH están aumentados varias veces en las células cancerosas humanas que en las células normales adyacentes³⁵. Este hallazgo está presumiblemente relacionado con su actividad proliferativa. De hecho, el cáncer es la única condición que ha sido

reportada en la cual la elevación del sistema del GSH está tan estrictamente regulada. Sin embargo, cuando una cisteína (y el GSH) promovieron compuestos tales como 2-L-oxotiazolidina-4-carboxilato (OTZ) se agregaron al cultivo de las células humanas de cáncer de pulmón mostrando muy altos niveles del GSH al principio, no se notó un incremento intracelular, mientras el GSH aumentó sustancialmente en las células normales³⁵. Esta respuesta diferencial está aún más pronunciada "*in vivo*". Hemos demostrado que en las ratas portadoras de tumor, el tratamiento de OTZ agota el GSH en los tumores³⁶.

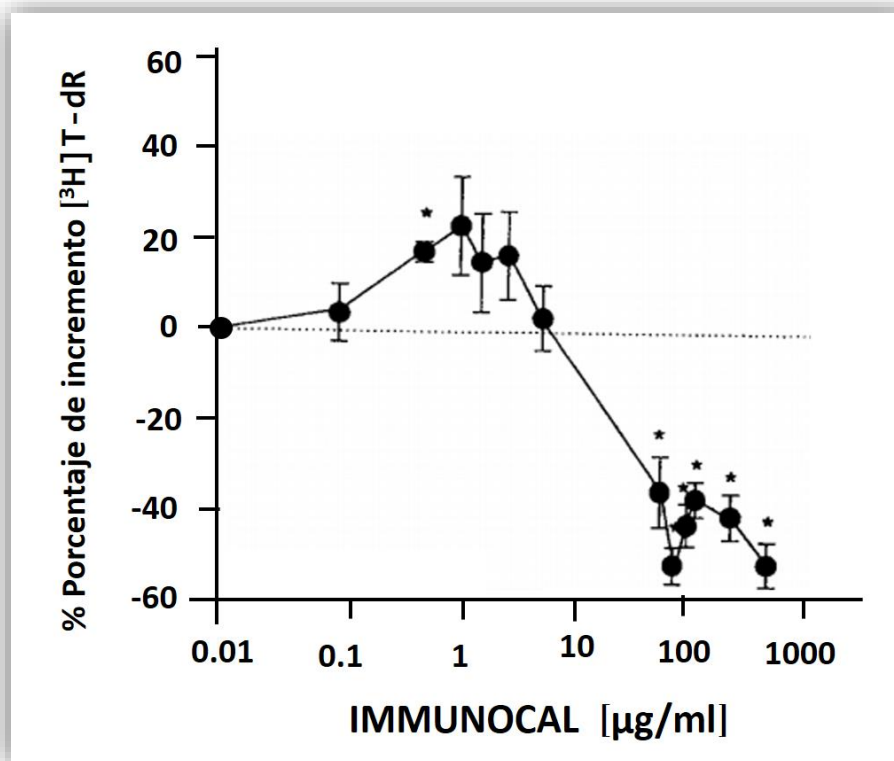
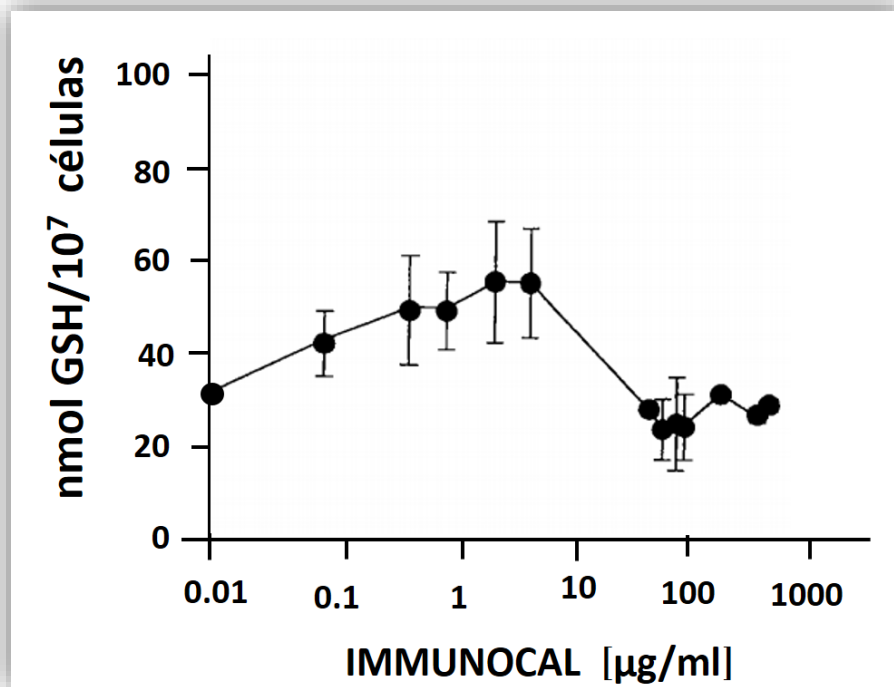


Figura 8. El Glutati3n intracelular en MATB WT. Cada punto representa la media $\pm$ SE de tres mediciones. * $p < 0.05$.

Más específicamente, un ensayo *in vitro* mostró que, en concentraciones que inducen la síntesis del GSH y la proliferación en células humanas normales (Figura 1), el IMMUNOCAL™ causó el agotamiento del GSH y la inhibición de la proliferación de células en un carcinoma mamario de rata (Figura 8) y las células Jurkat T (Figura 9)²¹.

La selectividad demostrada en estos experimentos se puede explicar por el hecho de que la síntesis del GSH se inhibe negativamente por su propia síntesis y puesto que, se ha mencionado que la línea basal del GSH intracelular en las células tumorales es mucho mayor que en las células normales, es más fácil de alcanzar el nivel en el cual la inhibición por retroalimentación negativa se produce en este sistema celular, que en un sistema celular no tumoral.

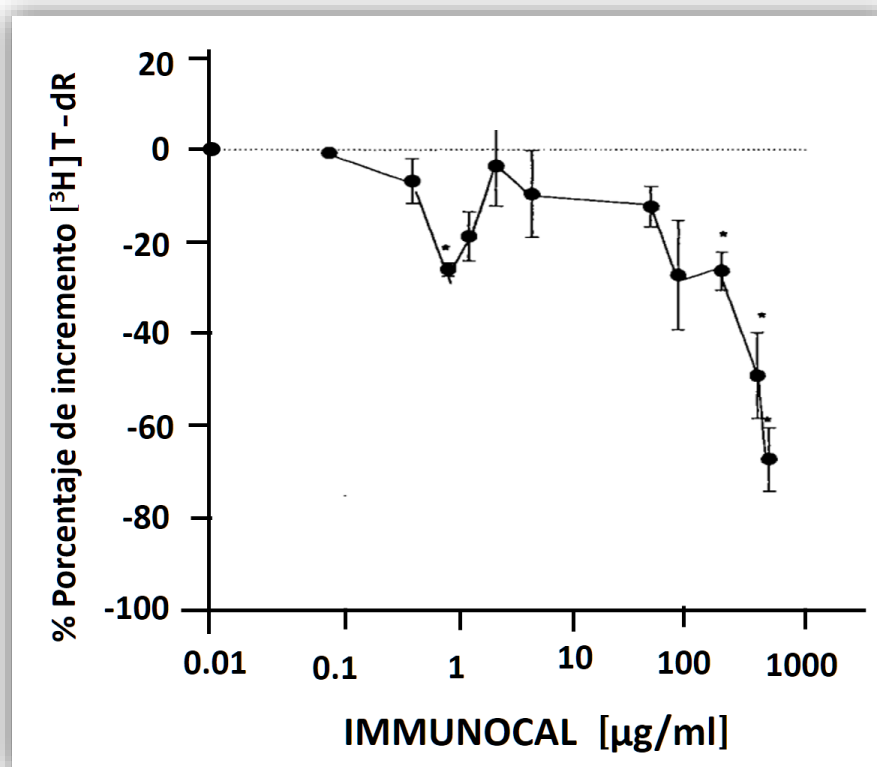


Figura 9. El glutatión intracelular en JURKAT. Cada punto representa la media de $\pm$ SE de tres mediciones.

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 del GSH en los linfocitos de la sangre eran sustancialmente superiores a lo normal al

principio, lo que probablemente reflejaba altos niveles tumorales del GSH. Al final 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 los niveles del GSH de linfocitos hacia los normales. Dos pacientes mostraron estabilización del tumor y el aumento de los niveles de la hemoglobina. En 3 pacientes, la enfermedad progresó con una tendencia hacia altos niveles del GSH en los linfocitos³⁷.

Un problema importante en el uso de los 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 el GSH, que es un efectivo agente desintoxicante, el cual es relativamente abundante en las células tumorales. De hecho, cuando la síntesis del GSH es inhibida por la butionina sulfoximina (BSO), la actividad de varios agentes quimioterapéuticos tales como son los agentes alquilantes se incrementa y la resistencia a fármacos puede ser revertida³⁶⁻³⁸. Sin embargo, el agotamiento concomitante del GSH en las células normales limita en gran medida la utilización práctica de esta modalidad de tratamiento.

Recientemente hemos demostrado que un profármaco selectivo del GSH tal como OTZ protege algo de tejido normal³⁶, pero también potencia la actividad de algunos agentes alquilantes³⁸. La aparente reducción selectiva de los niveles del GSH tumoral mediante la provisión de un precursor natural del GSH, tal como está contenida en el IMMUNOCAL™ parece estar asociada con la inhibición de la proliferación de las células cancerosas *in vitro*. Este precursor natural del GSH influye favorablemente en la síntesis del GSH en las células normales.

Estos resultados *in vitro* y los preliminares clínicos 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 selectivo del 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.

LA ANALOGÍA ENTRE IMMUNOCAL™ (HNMPi) Y LA LECHE HUMANA

La leche humana contiene aproximadamente 80% de proteínas del suero y 20% de caseína. Y lo contrario es verdad para la leche de vaca. Un análisis de la relación de la tasa de caseína y de las proteínas del suero en la leche de varios mamíferos indica claramente que la leche humana tiene la proporción más baja que cualquier especie de mamífero³⁹. Sobre la base de nuestros estudios de laboratorio, se mostraron los efectos inmunoprotectores y anticancerígenos del concentrado de las proteínas del suero de leche de vaca, resulta tentador

especular que este predominio de las proteínas del suero de la leche humana tiene ventaja y que por lo tanto representan una adaptación evolutiva.

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

Es bien sabido que la lactancia materna es superior al uso de fórmulas basadas en leche de vaca nutricionalmente similares para la salud de los bebés humanos. La lactancia materna protege contra la otitis media y la 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 cerebrales⁴². 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 que tuvieron lactancia materna a largo plazo⁴³. Así, el concepto de una actividad biológica, en adición, pero independiente de la eficacia nutricional, formulado para describir la actividad de inmuno-estimulación y la promoción del GSH del HNMPI IMMUNOCAL™, puede de hecho aplicar a la lactancia materna de recién nacidos y lactantes. La síntesis del glutatión parece ser el factor decisivo para el beneficio de la salud a partir de HNMPI.

Entonces puede ser apropiado para identificar las características comunes del HNMPI y de las proteínas del suero humano que son capaces de influir en la síntesis del GSH en el huésped. La cisteína, un factor limitante crucial en la síntesis del GSH, es tan abundante en las proteínas del suero de leche de vaca como en todas las proteínas de la leche humana y varias veces más abundantes que en toda la leche de vaca³⁹, ya que la mayoría de las caseínas no contiene cisteína o solamente uno o dos residuos de cisteína¹⁹. Como se mencionó anteriormente, los estudios demostraron que las proteínas de la leche más termolábiles son específicamente, la albúmina sérica, α -lactoalbúmina, y lactoferrina, y son cruciales para la expresión de la bioactividad del HNMPI. Como se muestra en la Tabla 1, estas proteínas son ricas en cistina y residuos de glutamylcisteína, precursores naturales del 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 principal factor de salud en la leche humana, no desnaturalizada por el calor de la pasteurización, se debe al predominio de las proteínas termolábiles ricas en cistina y que contienen el dipéptido Glu-Cys que son bioactivos característicos de HNMPI, estas proteínas son llamadas; albúmina del suero, α -lactoalbúmina, y lactoferrina. Este HNMPI difiere de otras proteínas de suero de leche disponibles en el mercado de concentrados por 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).

Componente	Leche de vaca	Leche humana	
Caseína (g/L)	26	3.2	0 o 2 Moléculas de cisteínas/sin enlace disulfuro
β -Lactoglobulina (g/L)	3.2	Insignificante	
α -lactoalbúmina (g/L)	1.2	2.8	
Seroalbúmina (g/L)	0.4	0.6	
Lactoferrina (g/L)	0.14	2.0	
Cisteína total (mol/L)	8.19×10^{-4}	13.87×10^{-4}	
Cisteína total (mg/g de proteína)	6.4	38.7	

Fuente: Ref. 19; Jennes 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 la leche de vaca contenidas en el 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 componentes precursores del GSH. El agotamiento del GSH celular ha sido implicado en la patogénesis de una serie de enfermedades degenerativas y estados de enfermedad, incluyendo la enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, arteriosclerosis, cataratas, fibrosis quística, la desnutrición, envejecimiento, SIDA y cáncer⁹.

Esta modulación nutracéutica recién descubierta del GSH por el uso del concentrado de proteínas aislado del suero de leche natural humanizada 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 del

GSH estén implicados en gran medida. Un estudio fármaco - epidemiológico extensivo del metabolismo del GSH y los métodos estandarizados de medición del GSH intracelular aplicables 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 M M, 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 Baruchet 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 aminoacids. Boca Raton, V Florida: 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 posible 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 utilization of gamma glutamylcystine 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. Dröege 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.
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 protéines du lactosérum bovin sur la multiplication de cellules cancéreuses humaines. CR Soc Biol 1991; 185:2319-323.
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, Lykkesfeldt 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, Svargorg 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 metastasis in mice. Cancer Res. 1994; 54:2310-2312.
34. Bosselaers IE, Caessens PW, Banboeket MA. Differential effects of milk proteins, BSA and soy on 4NOO – or MNNG-induced SCE'sub 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. J Pharm 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, Grauoard BI. Infant feeding and childhood cancer. *Lancet* 1988; 1:3
-

NOTAS:

- El dipéptido **glu-gly** está formado por la unión de los aminoácidos glutamato y cisteína y se denomina gamma-glutamilcisteína. Este dipéptido se encuentra en la leche humana según la explicación de este artículo o se puede formar dentro de las células por la unión de los aminoácidos citados. En un primer paso, el dipéptido gamma-glutamilcisteína se forma por la unión del aminoácido **L-glutamato** (ácido glutámico) con el aminoácido **cisteína** por la acción de la enzima gamma-glutamilcisteína sintetasa (también conocida como **glutamato cisteína ligasa**, cuyas siglas son GCL). (N del T).
- En el segundo paso, el aminoácido **glicina** se une al carbono terminal de la gamma-glutamilcisteína por la acción de la enzima **glutación sintetasa** con el uso de otro enlace fosfato procedente del ATP y así se forma el **glutación**. (N del T).
- **HNMPI** son las siglas en inglés **Humanized Native Serum Protein Isolate** que es el **Immunocal**. En México, por las diferentes traducciones de artículos y por hacer fácilmente comprensible e ilustrativo el concepto del producto, me atrevo a escribirlo y traducirlo como **“concentrado de proteínas bioactivas naturales aislado del suero de la leche bovina”**. El contenido del Immunocal son estas proteínas naturales. La idea de naturales se refiere a que no están procesadas por pases industriales. También se puede entender que están íntegras porque sus aminoácidos están bioactivos y no han sufrido alteraciones estructurales, en especial la cisteína que es muy delicada y lábil.

- En la época de este artículo, se medían las concentraciones del glutatión por ensayo espectrofotométrico, en la actualidad se mide por resonancia magnética nuclear dinámica. (N del T).
 - Las **células Jurkat** son una línea celular inmortalizada (población de células en un organismo celular que han evadido la senectud y se dividen indefinidamente) de linfocitos T obtenida de la sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia linfoide aguda (LLA) la cual fue establecida a finales de los años 70. La línea celular Jurkat es utilizada en estudios sobre la comunicación celular en linfocitos T. Su uso principal sin embargo, consiste en la prueba de nuevos medicamentos que podrían ser utilizados para el tratamiento del cáncer. (N del T).
-
-

Comentarios del traductor:

Este es un artículo clásico sobre el glutatión con un enfoque de explicación de la acción de las proteínas lácteas. El texto informa sobre el uso de las proteínas extraídas del suero lácteo y su uso como precursoras de los aminoácidos para formar el glutatión.

Un abordaje es sobre la aplicación de la alimentación de pacientes pediátricos afectados por el SIDA usando las proteínas lácteas y la presentación de sus resultados, lo que en su momento abrió una gran promesa para este tipo de pacientes. Se habla de la inhibición de la replicación del HIV por la presencia del glutatión y la eficiencia mejorada de la actividad de los linfocitos.

Se describen artículos relacionados con la observación del uso de estas proteínas y el aumento del glutatión en las células normales y el descenso de este tripéptido en las células de cáncer. Se narran las observaciones sobre el cáncer de colon resuelto en ratones y su relación con el aumento del glutatión.

Este trabajo fue escrito en los años 80's y causó gran expectativa. Es una colaboración del doctor René Oliver del Instituto Pasteur, de Francia, con el equipo de Montreal liderado por el doctor Sylvain Baruchel y colaboradores. En esa época se publicaron también más artículos sobre el uso de las proteínas lácteas, en el respaldo de pacientes con cáncer y SIDA escritos por el doctor Gustavo Bounous y colaboradores.

Se han escrito miles de artículos posteriormente sobre el glutatión y sus funciones en muchas afecciones de salud y se redujeron las publicaciones sobre las proteínas lácteas.

En la traducción de este documento, modifiqué muchas frases originales para buscar un sentido más orientado a la redacción en español con el propósito de dar un sentido más fácil de comprender, esperando no haber traicionado en demasía la intención informativa de los autores.

Puse unas notaciones en color verde de algunas palabras para facilitar su significado dentro del texto. Al final algunas notas aclaratorias sobre algunos términos que no fueron explicados en el escrito original, tal vez porque se supone que todos los lectores deben conocer las palabras y los procesos que las rodean.

La idea es que su lectura sea accesible a muchas personas interesadas en esta temática. Cada día hay más personas que hablan del glutatión y menos que saben sobre el abanico de posibilidades de las proteínas lácteas.

Espero no haber deteriorado la esencia de este trabajo y que sea de utilidad al lector.