

Tecnológicas

Evaluación in silico de péptidos bioactivos derivados de la digestión de proteínas presentes en la leche de bovino (*B. taurus*), oveja (*O. aries*), cabra (*C. hircus*) y búfalo (*B. bubalis*)

In Silico Evaluation of Bioactive Peptides Derived from the Digestion of Cow (*B. taurus*), Sheep (*O. aries*), Goat (*C. hircus*), and Buffalo (*B. bubalis*) Milk Proteins

  Jorge A. Barrero¹;
 Claudia M. Cruz²;
 Jenny Casallas³;
 Juan S. Vásquez⁴

¹ Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia,
jobarreroc@unal.edu.co

² Universidad Nacional de Colombia, Bogotá-Colombia,
marcela.cruz@gimnasiovermont.edu.co

³ Universidad Jorge Tadeo Lozano, Bogotá-Colombia,
jenny.casallasg@quesoslvdl.com.co

⁴ Colegio Anglo Americano, Bogotá-Colombia,
vasquezc.juans@caa.edu.co

ISSN-p: 0123-7799
ISSN-e: 2256-5337

Vol. 24, nro. 50, e1731

Recibido: 23 junio 2020
Aceptado: 11 noviembre 2020
Disponible: 16 diciembre 2020

©Instituto Tecnológico Metropolitano
Este trabajo está licenciado bajo
una Licencia Internacional
Creative Commons Atribución
(CC BY-NC-SA)



Cómo citar / How to cite

J. A. Barrero; C. M. Cruz; J. Casallas; J. S. Vásquez, “Evaluación in silico de péptidos bioactivos derivados de la digestión de proteínas presentes en la leche de bovino (*B. taurus*), oveja (*O. aries*), cabra (*C. hircus*) y búfalo (*B. bubalis*)”, *Tecnológicas*, vol. 24, nro. 50, e1731, 2021.
<https://doi.org/10.22430/22565337.1731>

Resumen

La creciente demanda de alimentos de alto valor nutricional ha inclinado el consumo de lácteos de leche bovina por leche proveniente de otras especies de rumiantes; no obstante, la fracción proteica de la leche es relativamente constante y se compone de caseínas: α S1-caseína, β -caseína, κ -caseína, y seroproteínas; α -lactoalbúmina y β -lactoglobulina. En la actualidad, los estudios de péptidos bioactivos derivados de la leche se centran en proteínas obtenidas de una única especie y se efectúan empleando enzimas ajenas al sistema digestivo humano. La presente investigación realizó una comparación cuantitativa de los péptidos bioactivos obtenidos de las caseínas y seroproteínas presentes en la leche de bovino (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*) y búfalo (*Bubalus bubalis*) a partir de procesos de digestión *in silico* catalizados por proteasas presentes en el sistema digestivo humano: pepsina (EC 3.4.23.1), tripsina (EC 3.4.21.4) y quimotripsina (EC 3.4.21.1). La caracterización de péptidos bioactivos y la digestión *in silico* fue realizada mediante BIOPEP-UMW. La evaluación cuantitativa se efectuó a partir del cálculo de frecuencias de liberación. Los resultados mostraron once clases de péptidos con acción biológica: estimulantes, inhibidores de Renina, inhibidores de DPP4, antioxidantes, inhibidores de ACE, inhibidores de DPP3, hipocolesterolémicos, inhibidores de CaMPDE, reguladores, anticancerígenos e inmunomoduladores. Los péptidos inhibidores de DPP4 presentaron la mayor frecuencia de liberación, lo que sitúa a la leche como una potencial fuente de metabolitos supresores de la acción proteolítica de DPP4 en la degradación de incretinas. Pese a los distintos valores de frecuencias de liberación, los cuatro perfiles totales de péptidos bioactivos correspondientes a la leche de cada especie no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$).

Palabras clave

Péptidos bioactivos, digestión *in silico*, caseína, seroproteínas, inhibidor de DPP4.

Abstract

The growing demand for food with high nutritional value has led to the replacement of bovine milk with milk from other ruminants. The protein fraction in milk is relatively constant among species and includes caseins (α S1-casein, β -casein, and κ -casein) and whey proteins (α -lactalbumin and β -lactoglobulin). Current studies into milk derived bioactive peptides focus on proteins obtained from a single species and are conducted using non-human proteases. In this paper, we make a quantitative comparison of the bioactive peptides obtained from the caseins and whey proteins present in bovine (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), goat (*Capra hircus*), and buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. The study is carried out by *in silico* digestion with the following proteolytic enzymes found in the human digestive system: pepsin (EC 3.4.23.1), trypsin (EC 3.4.21.4), and chymotrypsin (EC 3.4.21.1). *In silico* digestion and bioactive peptides were characterized using the BIOPEP-UMW database. Quantitative evaluation was carried out by calculating the bioactive peptides release frequencies. As a result, we found eleven types of biologically active peptides (stimulants, renin inhibitors, DPP4 inhibitors, antioxidants, ACE inhibitors, DPP3 inhibitors, hypocholesterolemic agents, CaMPDE inhibitors, regulators, anticarcinogenic agents, and immunomodulators). According to the findings, DPP4 inhibitors had the highest frequency of release, turning milk into a potential source of metabolites that suppress DPP4 activity, which, in turn, could lead to a reduced degradation of incretin hormones. Despite the different values in their frequency of release, the total number of bioactive peptides did not show a statistically significant difference ($p > 0.05$) among the milk proteins from each of the four species under study.

Keywords

Bioactive peptides, *in silico* digestion, casein, whey proteins, DPP4 inhibitor.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Consumo de leche

La leche desempeña un papel fundamental que inicia desde el periodo de lactancia en las distintas especies de mamíferos. La producción preservada de lactasa intestinal presenta, desde una perspectiva evolutiva, un rasgo que se asocia a la duración del proceso de amamantamiento y a la dependencia de la leche como un nutriente en el desarrollo de los mamíferos [1]. La sustitución de la leche en la dieta se ha visto limitada a causa del desafío que representa hallar una bebida que provea la amplia gama de nutrientes que esta ofrece [2].

La leche **bovina**, obtenida del rumiante *Bos taurus*, presenta el mayor porcentaje de consumo a nivel mundial con un 85 %; no obstante, la ingesta de leche derivada de otras especies rumiantes como *Bubalus bubalis* (búfalo), *Capra hircus* (cabra) y *Ovis aries* (oveja) corresponde a un 11 %, 2.3 % y 1.4 %, respectivamente. [3]. Estos porcentajes resultan ser bastante fluctuantes, pues, en la actualidad, factores como la preferencia de un tipo de leche frente a otra, la elección con base en el valor nutricional, o inclusive el aumento en la frecuencia de alergias a la leche bovina, inclinan la balanza hacia el consumo de leche proveniente de otros organismos rumiantes.

1.2 Fracción sólida de la leche

El consumo de leche de distintas especies representa una fuente de nutrientes variable, pues su contenido y valor nutricional no son del todo similar. La variedad en la composición química de la leche depende de numerosos factores: especie del mamífero, rasgos genéticos, variantes fisiológicas, entre otras [4]. En general, la leche es una suspensión de diferentes nutrientes entre los cuales se encuentran proteínas, grasas, azúcares, vitaminas y minerales. La fracción sólida de la leche (nutrientes grasos y no grasos) corresponde a un valor alrededor de 15 %, dentro del cual las proteínas representan un valor mayor al 3 %, en cuanto a sólidos no grasos [5].

Teniendo en cuenta que los sustratos de las enzimas proteolíticas corresponden a la fracción sólida no grasa, esta investigación se centra en la descripción de las diferentes concentraciones de proteínas en los distintos tipos de leche. Los valores de concentración se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1. Concentración de proteínas (g/L) en la leche de bovino, oveja, cabra y búfalo.
Fuente: Tabla obtenida y modificada de [6].

Proteína	Bovino (<i>B. taurus</i>)	Oveja (<i>O. aries</i>)	Cabra (<i>C. hircus</i>)	Búfalo (<i>B. bubalis</i>)
α S1-caseína	8-10.7	15.4-22.1	0-13.0	8.9
β -caseína	8.6-9.3	15.6-17.6	0-29.6	12.6-20.9
κ -caseína	2.3-3.3	3.2-4.3	2.8-13.4	4.1-5.4
α -lactoalbúmina	1.2-1.3	1-1.9	0.7-2.3	1.4
β -lactoglobulina	3.2-3.3	6.5-8.5	1.5-5.0	3.9

Las proteínas de la leche se agrupan en dos grandes categorías: caseínas y seroproteínas, siendo las primeras las de mayor abundancia. Las caseínas se caracterizan por la formación de micelas como consecuencia de la agrupación de las mismas [5]. Dentro de las caseínas se encuentran la α S1-caseína, β -caseína y la κ -caseína. Entre las seroproteínas, o proteínas del

suero, se encuentran la α -lactoalbúmina y la β -lactoglobulina. Estas proteínas son, en general, menos solubles que las caseínas y cumplen diversas funciones biológicas como constituyentes del complejo enzimático productor de lactosa. Es indispensable resaltar que la síntesis endógena de estas proteínas, como la de cualquier otro polipéptido, depende en gran parte del gen de la especie que codifique para este. Siendo así, se establece que las proteínas derivadas de los rumiantes anteriormente mencionados presentan cierto grado de similitud, más no son idénticas en su totalidad. Para las cuatro especies, existe una isoforma de cada caseína y cada seroproteína.

1.3 Péptidos Bioactivos (PBA)

Existe un abundante número de alimentos con propiedades nutraceuticas que se atribuyen a los productos de su digestión proteolítica; estos fragmentos aminoacídicos poseen un alto potencial de acción biológica y se denominan péptidos bioactivos (PBA) [7]. La leche se caracteriza por ser un alimento precursor de una gran variedad de PBA. Entre los productos de hidrólisis de las proteínas de la leche se reportan péptidos con acción inhibitoria de ACE, antioxidantes, inmunomoduladores, opioides, antimicrobianos, antihipertensivos y antidiabéticos [8], [9]. Ahora bien, la acción biológica del péptido depende de la secuencia de aminoácidos constituyentes, y esta a su vez, está determinada por los puntos de clivaje en el sustrato precursor del péptido por parte del catalizador proteolítico. La hidrólisis por proteasas ajenas al sistema digestivo humano produce PBA con acción biológica distinta a los que producirían las proteasas digestivas.

Las caseínas y seroproteínas anteriormente mencionadas, constituyen la fracción proteica de la leche, y, por tanto, son sustratos para las proteasas del sistema digestivo. Dado el grado de homología variable entre las isoformas de las proteínas presentes en la leche de bovino, oveja, cabra y búfalo, es válido afirmar que los puntos de clivaje, y consecuentemente los PBA liberados, variarán de una especie a otra.

1.4 Estudios e investigaciones *in silico*

La experimentación *in vitro* e *in vivo* son herramientas indispensables en las disciplinas científicas; no obstante, los recientes avances de la bioinformática han permitido desarrollar sistemas que complementan estas investigaciones mediante simulaciones computacionales de fenómenos químicos y biológicos. El estudio de PBA requiere montajes experimentales extensos y costos que limitan las posibilidades de investigación [10] mientras que las investigaciones *in silico*, o de simulación computacional, facilitan la identificación de fragmentos aminoacídicos a partir de métodos que se fundamentan en: análisis de la relación estructura-función de una secuencia polipeptídica, simulaciones de *docking* molecular y procesos de optimización estadística [11], [12].

La experimentación *in silico* no es independiente de la experimentación *in vitro* e *in vivo*. El estudio de los PBA se basa en el conjunto de estas tres metodologías a partir de procesos que comparen la producción, identificación y validación de péptidos mediante hidrólisis *in vitro*, cribado de bioactividad *in silico* y validación *in vivo* [13]. El desarrollo de estudios *in silico* es esencial para la identificación de fenómenos moleculares que posteriormente puedan ser comprobados y validados en organismos vivos. Siendo así, la presente investigación se enfoca en la evaluación de los PBA obtenidos a partir de procesos de digestión *in silico* catalizados por pepsina, tripsina y quimotripsina, empleando como sustratos a las isoformas de las caseínas y seroproteínas presentes en la leche de bovino (*B. taurus*), oveja (*O. aries*), cabra (*C. hircus*) y búfalo (*B. bubalis*).

2 METODOLOGÍA

2.1 Obtención de la secuencia de aminoácidos de las proteínas

A partir de la base UniProt, se obtuvo para cada isoforma un formato de tipo FASTA con la secuencia de aminoácidos correspondientes. UniProt agrupa una serie de bancos de datos bioinformáticos que ofrecen una correlación entre la secuencia y la función de distintas proteínas registradas [14]. El primer análisis se basó en la evaluación de la homología y la comparación de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas presentes en la leche de las cuatro especies. El estudio de homología se realizó a partir de la base de datos Clustal Omega del *EMBL-European Bioinformatics Institute* (EBI). Los valores de los parámetros fisicoquímicos fueron obtenidos a partir de la herramienta ProtParam en la base de datos ExPASy del *Swiss Institute of Bioinformatics* (SIB). Tanto Clustal Omega como ProtParam permiten extraer datos calculados a partir de la secuencia aminoácidos de un determinado polipéptido [15].

2.2 Digestión *in silico* y evaluación de los PBA producto de la proteólisis

La evaluación de las proteínas como precursoras de PBA se realizó mediante la base BIOPEP-UWM de la Universidad de Mazury en Olsztyn, Polonia. Las proteínas fueron sometidas a digestión *in silico* bajo la acción de enzimas presentes en un proceso de digestión *in vivo*: Pepsina (EC 3.4.23.1) a pH 1.3, Tripsina (EC 3.4.21.4) y Quimotripsina (EC 3.4.21.1).

Los PBA resultantes de la digestión fueron registrados en las Tablas 3 a 7. Para cada proteína se calcularon tres parámetros planteados por [16], a partir de los cuales se realizó un análisis comparativo. Estos parámetros fueron calculados mediante (1), (2) y (3). La frecuencia de liberación de fragmentos peptídicos bioactivos (A_E) se halló a partir de (1):

$$A_E = d / N \quad (1)$$

Donde d corresponde al número de péptidos bioactivos con actividad específica liberados por acción de determinadas enzimas y N corresponde al número de aminoácidos presentes en una secuencia. La frecuencia relativa porcentual de liberación de fragmentos bioactivos (W) se obtuvo mediante (2):

$$W = (A_E / (a/N)) \times 100 \quad (2)$$

Donde A_E corresponde a los valores de frecuencia obtenidos a partir de (1), a corresponde al número total de biopéptidos liberados y N corresponde al número de aminoácidos presentes en el sustrato. Los resultados de (2) fueron registrados en las Figuras 1 a 5.

Posteriormente, se realizó una sumatoria de los péptidos liberados del conjunto de proteínas pertenecientes a una única especie para determinar un perfil total de PBA obtenidos de la leche de cada organismo. De este modo, fue posible calcular la frecuencia media mediante (3):

$$A_s = a_t / N_t \quad (3)$$

Donde a_t corresponde al número de péptidos bioactivos liberados de un conjunto de proteínas de una misma especie por acción de enzimas específicas y N_t corresponde al número total de aminoácidos presentes en las proteínas de la leche de cada especie. Finalmente, los

datos obtenidos de (3) fueron sometidos a un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA) y a un análisis de medias realizado mediante la prueba de Tukey.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de las propiedades fisicoquímicas de las isoformas

Como se observa en la Tabla 2, el registro de variación en el número de aminoácidos para una misma proteína entre las diferentes especies es mínimo. La mayor disimilitud se presenta en la α S1-caseína de *B. bubalis* respecto a las isoformas de las otras especies; una diferencia de ocho residuos en la α S1-caseína de *B. bubalis* puede tener una repercusión considerable al comparar el número de PBA liberados contra los PBA de la misma proteína obtenidos de las otras especies. Las demás isoformas varían entre especie por un número de residuos no superior a dos.

La diferencia de masa molecular alude a la variación de residuos entre las secuencias polipeptídicas. Las enzimas proteasas seleccionadas presentan alta esteroespecificidad frente a los aminoácidos que componen el enlace peptídico que se busca hidrolizar; la pepsina, en condiciones de $\text{pH} < 2$, muestra afinidad por el clivaje de enlaces constituidos por Phe, Tyr, Trp y Leu; por otro lado, la tripsina presenta alta afinidad por residuos de Lys y Arg; y, finalmente, la quimotripsina es afín a los enlaces péptidos compuestos por Trp, Tyr y Phe [18]. Siendo así, se establece que los residuos variables en las isoformas suponen que cada proteína presentará diferencias en los puntos de clivaje proteolítico y en la secuencia en los péptidos producto de la digestión.

Entre las propiedades fisicoquímicas reportadas, punto isoeléctrico (pI) e hidropaticidad, se evidencia un alto grado de similitud en los valores obtenidos. La escala de hidropaticidad empleada refleja la solubilidad de una proteína en una solución acuosa, clasificando como solubles a los polipéptidos con valores inferiores a cero. En los resultados se observa que, a excepción de las isoformas de β -lactoglobulina de *O. aries*, *C. hircus* y *B. bubalis*, todas las proteínas presentan un grado considerable de hidrofiliidad. Dadas las condiciones acuosas en las que se lleva a cabo los procesos digestivos, se destaca la solubilidad del sustrato como una propiedad que facilita los procesos proteolíticos de las enzimas digestivas.

3.2 Evaluación de la homología entre las isoformas

Las Tablas 3 a 7 presentan el grado de homología entre las isoformas correspondientes a cada organismo. La representación en forma de matriz permite obtener la relación entre las cuatro especies de forma simultánea. Para las cinco proteínas estudiadas se cumple que: el bovino (*B. taurus*) y el búfalo (*B. bubalis*) presentan isoformas con un grado de homología mayor a 90 %, y la cabra (*C. hircus*) y la oveja (*O. aries*) presentan isoformas con un grado de homología mayor a 95 %. Pese a que las cuatro especies de rumiantes pertenecen a la familia *Boviniidae*, *B. taurus* y *B. bubalis* son especies pertenecientes a la subfamilia *Bovinae* mientras que *C. hircus* y *O. aries* pertenecen a la subfamilia *Antilopinae* [20]. Diferentes estudios se han centrado en dilucidar la relación filogenética entre las especies estudiadas por medio de análisis moleculares. Como concluyen [21], a partir de la evaluación de la homología de la secuencia de nucleótidos que codifican para la κ -caseína se determinó: un 92.7 % de homología entre *O. aries* y *B. taurus* y un 96.7 % de similitud entre *B. bubalis* y *B. taurus*. Adicionalmente, se encontró, con excepción de leves polimorfismos, una secuencia idéntica entre *O. aries* y *C. hircus*.

Tabla 2. Número de residuos y propiedades fisicoquímicas de las proteínas: masa molecular, punto isoelectrico e hidropaticidad. Fuente: datos obtenidos a partir de [17].

Proteína	Especie	Número de aminoácidos	Masa molecular (Da)	pI	Hidropaticidad (GRAVY)
α S1-caseína	<i>B. taurus</i>	214	24528.94	4.98	-0.481
	<i>O. aries</i>	214	24305.71	5.32	-0.454
	<i>C. hircus</i>	214	24289.59	5.32	-0.534
	<i>B. bubalis</i>	206	23443.82	4.89	-0.367
β -caseína	<i>B. taurus</i>	224	25107.33	5.26	-0.154
	<i>O. aries</i>	222	24875.13	5.26	-0.129
	<i>C. hircus</i>	222	24865.09	5.26	-0.123
	<i>B. bubalis</i>	224	25106.44	5.26	-0.130
κ -caseína	<i>B. taurus</i>	190	21269.35	6.29	-0.287
	<i>O. aries</i>	192	21438.38	5.78	-0.318
	<i>C. hircus</i>	192	21441.32	5.53	-0.328
	<i>B. bubalis</i>	190	21397.56	6.83	-0.259
α -lactoalbúmina	<i>B. taurus</i>	142	16246.61	4.92	-0.169
	<i>O. aries</i>	142	16315.67	4.81	-0.192
	<i>C. hircus</i>	142	16254.61	5.06	-0.196
	<i>B. bubalis</i>	142	16274.62	4.81	-0.173
β -lactoglobulina	<i>B. taurus</i>	178	19883.25	4.93	-0.010
	<i>O. aries</i>	180	19921.40	5.44	0.060
	<i>C. hircus</i>	180	19975.53	5.50	0.070
	<i>B. bubalis</i>	180	20023.44	4.93	0.038

Tabla 3. Matrices de Homología en la α S1-caseína. Fuente: datos tomados de [19].

α S1-caseína				
	<i>O. aries</i>	<i>C. hircus</i>	<i>B. taurus</i>	<i>B. bubalis</i>
<i>O. aries</i>	100.00	97.20	88.32	87.38
<i>C. hircus</i>	97.20	100.00	87.85	86.89
<i>B. taurus</i>	88.32	87.85	100.00	94.66
<i>B. bubalis</i>	87.38	86.89	94.66	100.00

Tabla 4. Matrices de Homología en la β -caseína. Fuente: datos tomados de [19].

β -caseína				
	<i>O. aries</i>	<i>C. hircus</i>	<i>B. taurus</i>	<i>B. bubalis</i>
<i>O. aries</i>	100.00	99.10	92.79	93.24
<i>C. hircus</i>	99.10	100.00	91.89	92.34
<i>B. taurus</i>	92.79	91.89	100.00	97.77
<i>B. bubalis</i>	93.24	92.34	97.77	100.00

Tabla 5. Matrices de Homología en la κ -caseína. Fuente: datos tomados de [19].

κ -caseína				
	<i>O. aries</i>	<i>C. hircus</i>	<i>B. taurus</i>	<i>B. bubalis</i>
<i>O. aries</i>	100.00	95.83	85.26	86.32
<i>C. hircus</i>	95.83	100.00	85.26	87.37
<i>B. taurus</i>	85.26	85.26	100.00	92.63
<i>B. bubalis</i>	86.32	87.37	98.59	100.00

Tabla 6. Matrices de Homología en la α -lactoalbúmina. Fuente: datos tomados de [19].

α -lactoalbúmina				
	<i>O. aries</i>	<i>C. hircus</i>	<i>B. taurus</i>	<i>B. bubalis</i>
<i>O. aries</i>	100.00	97.89	95.07	96.48
<i>C. hircus</i>	97.89	100.00	97.18	98.59
<i>B. taurus</i>	95.07	97.18	100.00	98.59
<i>B. bubalis</i>	96.48	98.59	98.59	100.00

Tabla 7. Matrices de Homología en la β -lactoglobulina. Fuente: datos tomados de [19].

β -lactoglobulina				
	<i>O. aries</i>	<i>C. hircus</i>	<i>B. taurus</i>	<i>B. bubalis</i>
<i>O. aries</i>	100.00	97.75	94.94	95.51
<i>C. hircus</i>	97.75	100.00	96.11	96.67
<i>B. taurus</i>	94.94	96.11	100.00	98.33
<i>B. bubalis</i>	95.51	96.67	98.33	100.00

3.3 PBA obtenidos de la digestión *in silico* mediante BIOPEP-UWM

El proceso de digestión catalizado por las enzimas expuestas anteriormente se realizó mediante la base de datos BIOPEP-UWM donde, a partir de la secuencia de las proteínas presentadas en formato tipo FASTA, se obtiene el número de PBA, su acción biológica y su respectiva secuencia. Los aminoácidos se presentan en nomenclatura de una letra. Los PBA resultantes se muestran en las Tablas 8 a 12.

3.4 Frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA bajo proteólisis *in silico* catalizada por Tripsina, Quimotripsina y Pepsina (pH 1.3)

A partir de los datos presentados en las Tablas 8 a 12, se procedió a calcular los valores de frecuencia de liberación de PBA mediante (1). Con base en estos resultados fue posible hallar la frecuencia relativa porcentual de obtención de PBA calculada mediante (2). Los valores de frecuencia relativa porcentual permiten realizar una comparación a nivel de porcentaje entre la frecuencia de liberación de PBA a partir de cada isoforma. Los resultados obtenidos se presentan en las Figuras 1 a 5.

Tabla 8. PBA obtenidos de la digestión *in silico* de la α S1-caseína. Fuente: elaboración propia.

Especie	Acción	Péptidos	Secuencias
<i>B. taurus</i>	Estimulante	2	VPL, IL
	Inhibidor de ACE	8	GY, AY, PL, GK, AR, EK, GTQY, IL
	Antioxidante	4	AY, EL, PEL, GTQY
	Inhibidor de DPP4	11	EK, PL, AY, GY, IL, PK, QF, QL, SK, VN, VPL
	Inhibidor de Renina	1	QF
	Inhibidor de DDP3	1	SM
<i>O. aries</i>	Estimulante	1	IL
	Inhibidor de ACE	8	GY, AY, PL, PL, QK, AR, GTQY, IL
	Antioxidante	3	AY, EL, GTQY
	Inhibidor de DPP4	10	PL, PL, AY, GY, IL, IN, PK, QF, QL, SK
	Inhibidor de Renina	1	QF
	Inhibidor de DDP3	1	SM
<i>C. hircus</i>	Estimulante	1	IL
	Inhibidor de ACE	8	GY, AY, PL, PL, GL, QK, AR, GTQY, IL
	Antioxidante	3	AY, EL, GTQY
	Inhibidor de DPP4	11	GL, PL, PL, AY, GY, IL, IN, PK, QF, QL, SK
	Inhibidor de Renina	1	QF
	Inhibidor de DDP3	1	SM
<i>B. bubalis</i>	Estimulante	2	VPL, IL
	Inhibidor de ACE	7	GY, AY, PL, GK, AR, GTQY, IL
	Antioxidante	2	AY, GTQY
	Inhibidor de DPP4	8	VPL, PL, AY, GY, IL, PK, QF, QL
	Inhibidor de Renina	1	QF
	Inhibidor de DDP3	1	SM

Tabla 9. PBA obtenidos de la digestión *in silico* de la β -caseína. Fuente: elaboración propia.

Especie	Acción	Péptidos	Secuencias
<i>B. taurus</i>	Estimulante	3	VL, VL, IL
	Inhibidor de ACE	8	PQR, VY, PL, PL, VK, AR, DM, IL
	Antioxidante	2	EL, VY
	Inhibidor de DPP4	17	AL, SL, SL, PL, PL, IH, IL, IN, PF, PF, PF, PK, TL, VK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	5	IH, PF, PF, PF, VY
	Inmunomodulador	1	PGPIP
	Anticancerígeno	1	PGPIP
<i>O. aries</i>	Estimulante	4	VL, VL, IL, IL
	Inhibidor de ACE	10	VY, VPK, PL, PL, PL, VK, AR, DM, IL, IL
	Antioxidante	1	VY
	Inhibidor de DPP4	19	AL, SL, SL, PL, PL, PL, IH, IL, IL, IN, PF, PF, PF, PK, TL, VK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	5	IH, PF, PF, PF, VY
<i>C. hircus</i>	Estimulante	4	VL, VL, IL, IL
	Inhibidor de ACE	9	VY, VPK, PL, PL, PL, VK, DM, IL, IL
	Antioxidante	1	VY
	Inhibidor de DPP4	18	SL, SL, PL, PL, PL, IH, IL, IL, IN, PF, PF, PF, PK, TL, VK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	5	IH, PF, PF, PF, VY
<i>B. bubalis</i>	Estimulante	3	VL, VL, IL
	Inhibidor de ACE	8	PQR, VY, PL, PL, VK, AR, DM, IL
	Antioxidante	2	EL, VY
	Inhibidor de DPP4	17	AL, SL, SL, PL, PL, IH, IL, IN, PF, PF, PF, PK, TL, VK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	5	IH, PF, PF, PF, VY

Tabla 10. PBA obtenidos de la digestión *in silico* de la κ -caseína. Fuente: elaboración propia.

Especie	Acción	Péptidos	Secuencias
<i>B. taurus</i>	Estimulante	1	VL
	Inhibidor de ACE	6	PSY, IAK, SF, SF, AR, PH,
	Inhibidor de DPP4	13	AL, IPIQY, IN, PF, PH, PY, PY, QF, QW, SF, SF, TL, VL
	Inhibidor de Renina	3	QF, SF, SF
	Inhibidor de DDP3	1	PF
<i>O. aries</i>	Estimulante	1	VL
	Inhibidor de ACE	6	PSY, IAK, SF, SF, AR, PH
	Inhibidor de DPP4	14	AL, IPIQY, IN, PF, PH, PN, PY, PY, QF, QW, SF, SF, TL, VL
	Inhibidor de Renina	3	QF, SF, SF
	Inhibidor de DDP3	1	PF
<i>C. hircus</i>	Estimulante	1	VL
	Inhibidor de ACE	6	PSY, IAK, SF, SF, AR, PH
	Inhibidor de DPP4	14	AL, IPIQY, IN, PF, PH, PN, PY, PY, QF, QW, SF, SF, TL, VL
	Inhibidor de Renina	3	QF, SF, SF
	Inhibidor de DDP3	1	PF
<i>B. bubalis</i>	Estimulante	1	VL
	Inhibidor de ACE	5	PSK, IAK, SF, SF, PH
	Inhibidor de DPP4	15	AL, IPIQY, IN, PF, PH, PN, PY, PY, QF, QW, SF, SF, TL, TR, VL
	Inhibidor de Renina	3	QF, SF, SF
	Inhibidor de DDP3	1	PF

Tabla 11. PBA obtenidos de la digestión *in silico* de la α -lactoalbúmina. Fuente: elaboración propia.

Especie	Acción	Péptidos	Secuencias
<i>B. taurus</i>	Estimulante	1	IL
	Antioxidante	2	AH, EL
	Inhibidor de ACE	7	GY, IW, GL, SF, AH, PH, IL
	Inhibidor de DPP4	9	AL, GL, AH, GY, IL, IW, PH, SF, TK
	Inhibidor de Renina	1	SF
<i>O. aries</i>	Estimulante	1	IL
	Antioxidante	1	AH
	Inhibidor de ACE	7	IW, GL, SF, AH, PH, DY, IL
	Inhibidor de DPP4	8	AL, GL, AH, IL, IW, PH, SF, TK,
	Inhibidor de Renina	1	SF
	Regulador	1	DY
<i>C. hircus</i>	Estimulante	1	IL
	Antioxidante	1	AH
	Inhibidor de ACE	8	IW, GL, QK, SF, AH, PH, DY, IL
	Inhibidor de DPP4	8	AL, GL, AH, IL, IW, PH, SF, TK
	Inhibidor de Renina	1	SF
	Regulador	1	DY
<i>B. bubalis</i>	Estimulante	1	IL
	Antioxidante	2	AH, EL
	Inhibidor de ACE	7	IW, GL, SF, AH, PH, DY, IL
	Inhibidor de DPP4	8	AL, GL, AH, IL, IW, PH, SF, TK
	Inhibidor de Renina	1	SF
	Regulador	1	DY

Tabla 12. PBA obtenidos de la digestión *in silico* de la β -lactoglobulina. Fuente: elaboración propia.

Especie	Acción	Péptidos	Secuencias
<i>B. taurus</i>	Estimulante	2	VL, VL
	Antioxidante	2	IR, VY
	Inhibidor de ACE	9	IR, VY, VAGTW, GL, VR, QK, SF, EK, IIAEK
	Inhibidor de DPP4	16	EK, AL, AL, AL, AL, SL, GL, VR, IPAVF, IR, PM, SF, TK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	1	VY
	Inhibidor de Renina	2	IR, SF
	Inhibidor de CaMPDE	1	IR
	Hipocolesterolémico	1	IIAEK
<i>O. aries</i>	Estimulante	2	VL, VL
	Antioxidante	2	IR, VY
	Inhibidor de ACE	10	IR, VY, VAGTW, AF, GL, GL, VR, QK, EK, IIAEK
	Inhibidor de DPP4	17	EK, AL, AL, AL, AL, SL, GL, GL, VR, IPAVF, AF, IR, PM, TK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	1	VY
	Inhibidor de Renina	1	IR
	Inhibidor de CaMPDE	1	IR
	Hipocolesterolémico	1	IIAEK
<i>C. hircus</i>	Estimulante	2	VL, VL
	Antioxidante	2	IR, VY
	Inhibidor de ACE	10	IR, VY, VAGTW, AF, GL, GL, VR, QK, EK, IIAEK
	Inhibidor de DPP4	17	EK, AL, AL, AL, AL, SL, GL, GL, VR, IPAVF, AF, IR, PM, TK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	1	VY
	Inhibidor de Renina	1	IR
	Inhibidor de CaMPDE	1	IR
	Hipocolesterolémico	1	IIAEK

Especie	Acción	Péptidos	Secuencias
<i>B. bubalis</i>	Estimulante	2	VL, VL
	Antioxidante	2	IR, VY
	Inhibidor de ACE	10	IR, VY, VAGTW, GL, GL, VR, QK, SF, EK, IIAEK
	Inhibidor de DPP4	17	EK, AL, AL, AL, AL, SL, GL, GL, VR, IPAVF, IR, PM, SF, TK, VL, VL, VY
	Inhibidor de DPP3	1	VY
	Inhibidor de Renina	2	IR, SF
	Inhibidor de CaMPDE	1	IR
	Hipocolesterolémico	1	IIAEK

3.5 Análisis de frecuencias relativas porcentuales de liberación de PBA

Los valores de la frecuencia relativa porcentual permiten evidenciar la variación en la producción de PBA entre las cuatro especies. A partir del análisis de varianza, se obtuvo un valor de $p > 0.05$. Asimismo, al realizar la prueba de Tukey se determinaron valores $< \text{HSD}$, por ende, se concluye que no existe una diferencia estadísticamente significativa ($p > 0.05$) en los valores de frecuencia relativa porcentual entre las cuatro especies.

Los resultados presentados en las Figuras 1 a 5 se analizan a continuación de forma específica para cada sustrato; es decir, de forma particular para cada isoforma del bovino (*B. taurus*), oveja (*O. aries*), cabra (*C. hircus*) y búfalo (*B. bubalis*). No obstante, se destaca que, para las cinco proteínas, la clase de PBA con mayor frecuencia relativa porcentual de liberación en las cuatro isoformas corresponde a los inhibidores de DPP4.

Para la αS1 -caseína, la isoforma de la cabra presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de inhibidores de DPP4 con un valor de 44.00 %. Las isoformas de la oveja y el búfalo presentan la mayor frecuencia relativa porcentual, 33.30 %, de liberación de PBA con acción inhibitoria de ACE. La isoforma del bovino, con un valor de 14.80 %, presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA con acción antioxidante. La isoforma del búfalo presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA con acción estimulante, 9.50 %. Los PBA con acción inhibitoria de Renina y DPP3 presentan una mayor frecuencia relativa porcentual de liberación a partir de la isoforma del búfalo, 4.80 %.

En cuanto a los PBA obtenidos de la β -caseína, la isoforma de la oveja presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de inhibidores de DPP4 con un valor de 48.70 %.

La isoforma de la oveja también presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de inhibidores de ACE con un valor de 25.60 %. Por otro lado, la mayor frecuencia relativa porcentual para PBA inhibidores de DPP3 y PBA estimulantes corresponde a: el búfalo con un 14.26 %, y la cabra con un 10.80 %, respectivamente. La mayor frecuencia relativa porcentual para PBA antioxidantes corresponde a la isoforma del búfalo con un valor de 5.70 %.

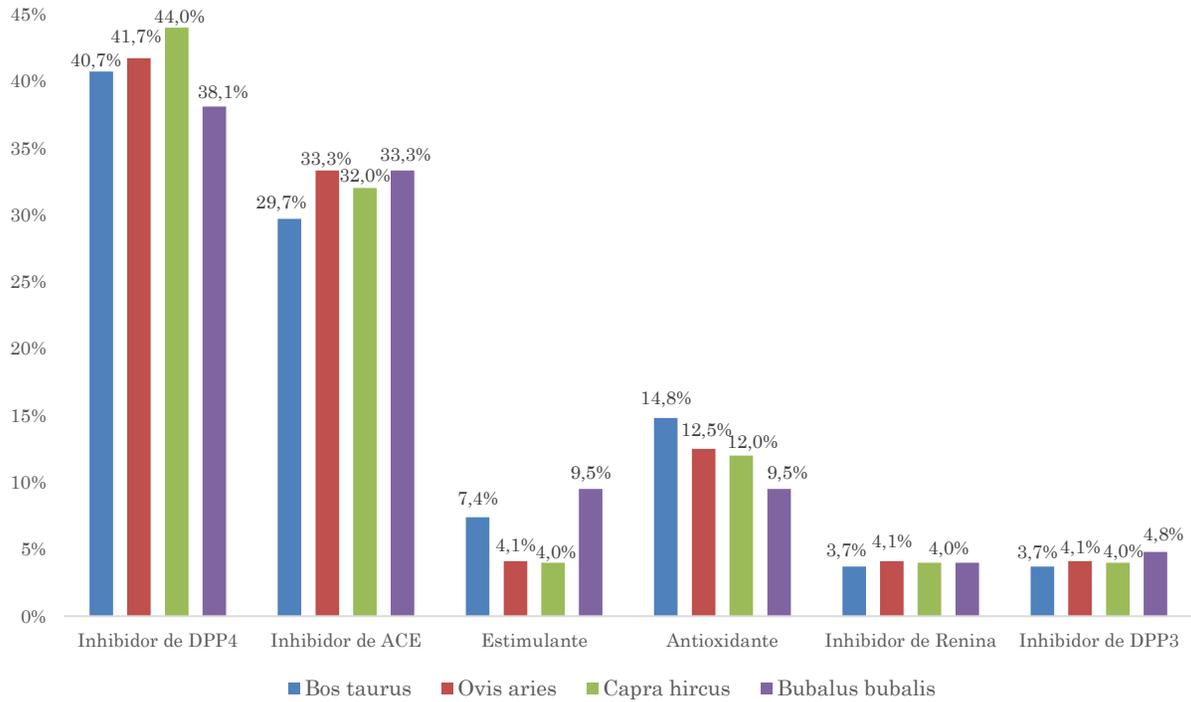


Figura 1. Frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA con α 1-caseína como sustrato. La evaluación estadística muestra $p>0.05$ en los análisis de varianza y de medias. Fuente: elaboración propia.

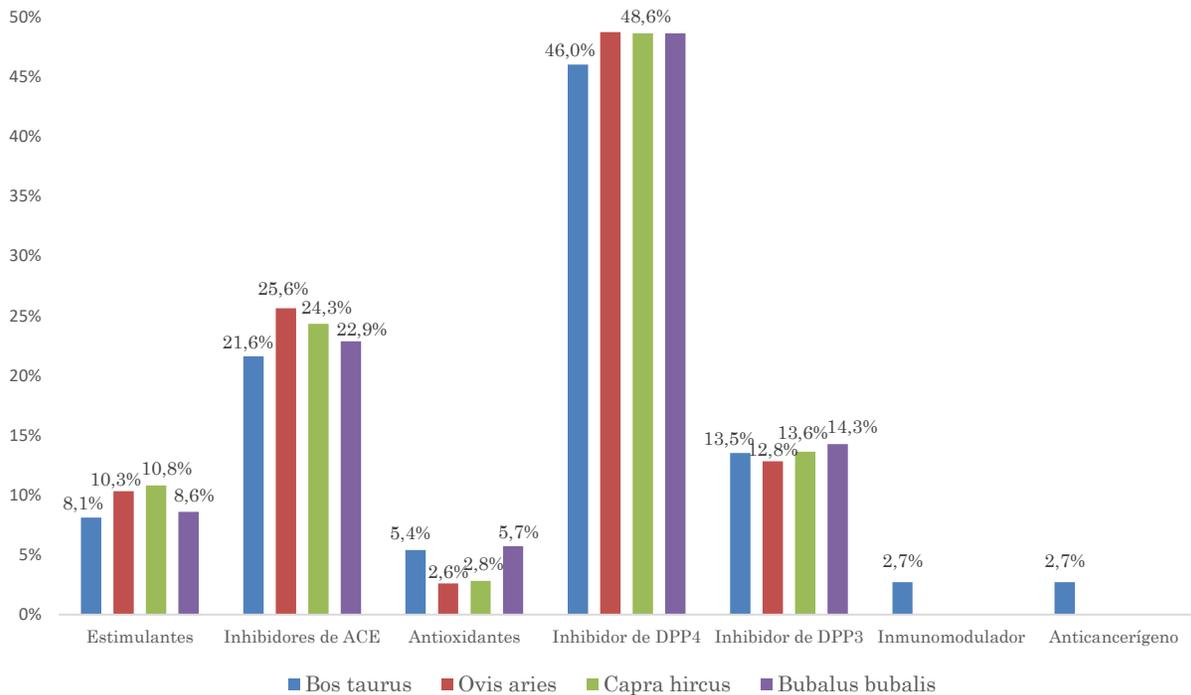


Figura 2. Frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA con β -caseína como sustrato. La evaluación estadística muestra $p>0.05$ en los análisis de varianza y de medias. Fuente: elaboración propia.

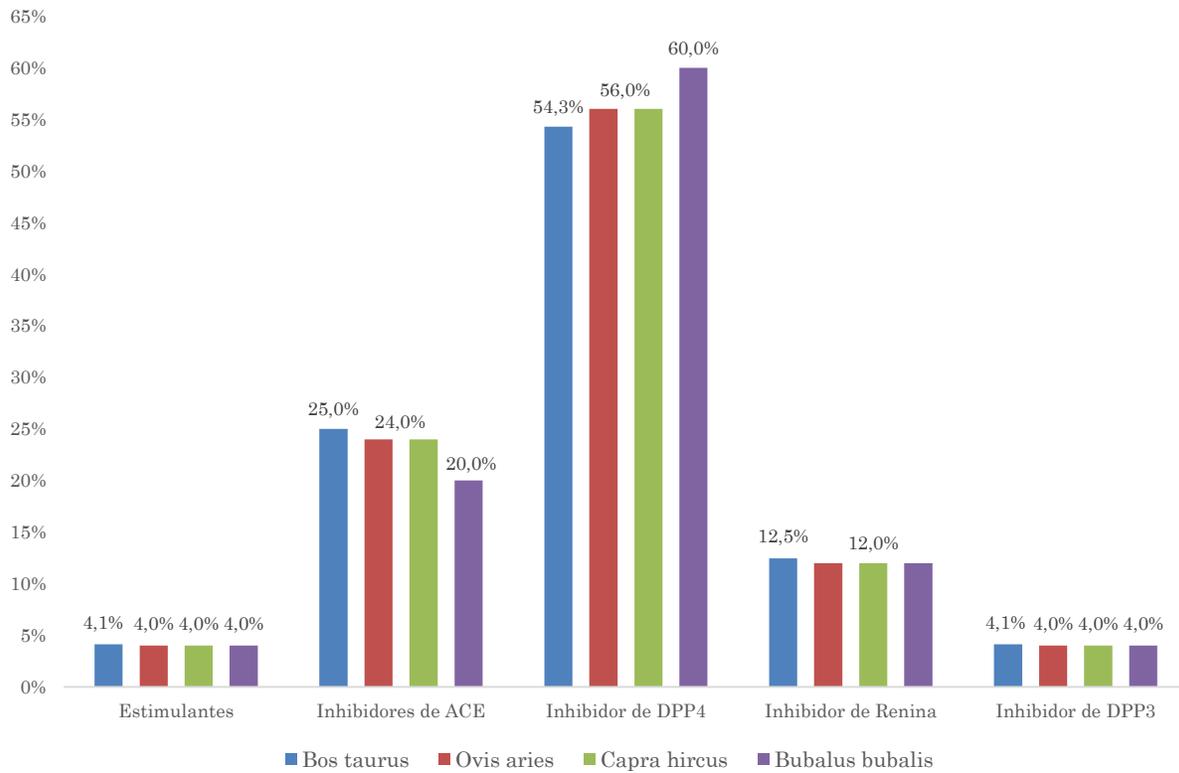


Figura 3. Frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA con κ -caseína como sustrato. La evaluación estadística muestra $p > 0.05$ en los análisis de varianza y de medias. Fuente: elaboración propia.

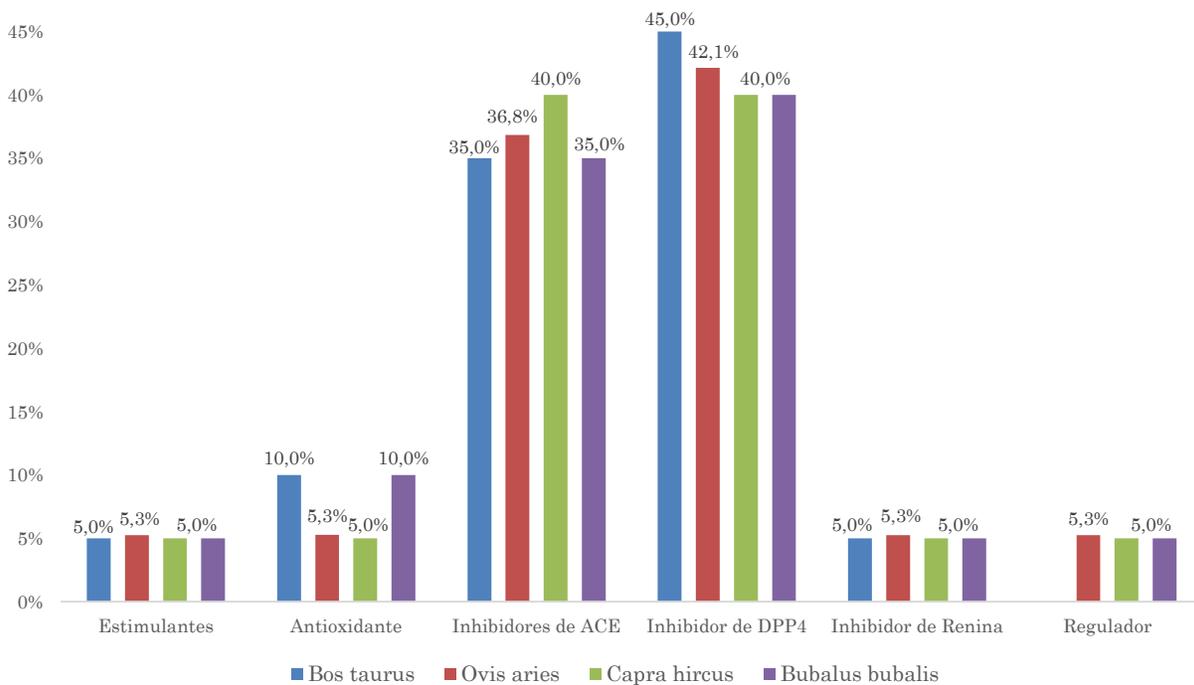


Figura 4. Frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA con α -lactoalbúmina como sustrato. La evaluación estadística muestra $p > 0.05$ en los análisis de varianza y de medias. Fuente: elaboración propia.

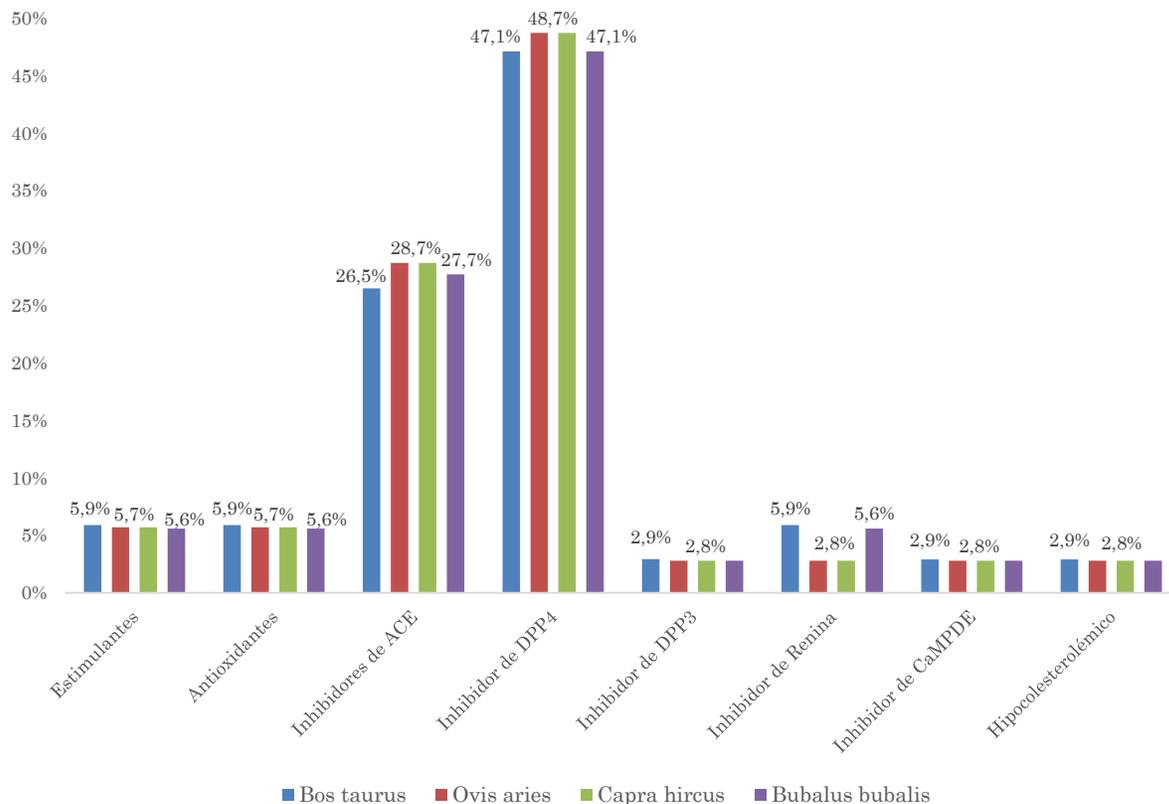


Figura 5. Frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA con β -lactoglobulina como sustrato. La evaluación estadística muestra $p > 0.05$ en los análisis de varianza y de medias. Fuente: elaboración propia.

Para la κ -caseína, la isoforma del búfalo presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de inhibidores de DPP4 con un valor de 60.00 %. La isoforma del bovino presenta la mayor frecuencia relativa porcentual para cuatro clases de PBA: inhibidores de ACE, con un 25.00 %; inhibidores de Renina, con un 12.46 %; e inhibidores de DPP3 y estimulantes, ambos con un 4.13 %.

Respecto a los PBA producto de la hidrólisis de la α -lactoalbúmina, la isoforma del bovino, con un valor de 45.00 %, presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de inhibidores de DPP4. La isoforma de la cabra también presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de inhibidores de ACE con un valor de 40.00 %. Los PBA con acción antioxidante presentan la mayor frecuencia relativa porcentual en las isoformas del búfalo y del bovino, con un valor de 10.00 % para ambos. La isoforma de la oveja presenta la mayor frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA reguladores, inhibidores de renina y estimulantes, todos con un valor de 5.26 %.

Por último, para la β -lactoglobulina, en cuanto a los PBA de tipo inhibidores de DPP4 y ACE, las isoformas de la oveja y la cabra presentan la mayor frecuencia relativa porcentual con un valor de 48.70 % y 28.70 %, respectivamente. La isoforma del bovino presenta la mayor frecuencia relativa porcentual para PBA antioxidantes, estimulantes e inhibidores de Renina, todos con un valor de 5.90 %. Así mismo, los PBA hipocolesterolémicos, inhibidores de CaMPDE e inhibidores de DPP3 presentan la mayor frecuencia relativa porcentual en la isoforma del bovino con valores de 2.90 %, 2.90 % y 2.93 %, respectivamente.

La caracterización e identificación *in silico* de productos peptídicos con acción biológica es actualmente un área de investigación fluctuante debido a que la clasificación de un péptido

como PBA requiere que su bioactividad sea validada *in vitro*. Por esta razón, a medida que se identifican nuevos agentes biológicos derivados de las proteínas de la leche, las bases como BIOPEP-UMW deben actualizarse y añadir los nuevos PBA.

Hacia el año 2009, [22] realizaron un estudio *in silico* de las proteínas presentes en la leche bovina. En esta investigación se evidenció una frecuencia relativa porcentual del 2.40 % en cuanto a la liberación de PBA inmunomoduladores derivados de la β -caseína de *B. taurus*. La simulación proteolítica se llevó a cabo empleando diferentes enzimas, algunas ajenas al sistema digestivo humano; por ende, algunos de los valores de frecuencia relativa porcentual de liberación de PBA difieren frente a los resultados obtenidos en el presente estudio. No obstante, en concordancia con esta investigación, se concluye que la mayor parte de los productos peptídicos con acción biológica son dipéptidos o tripéptidos y se enfatiza en la β -caseína, κ -caseína y α -lactoalbúmina de *B. taurus* como potenciales fuente de PBA al ser sometidas a proteólisis catalizada por tripsina. Adicionalmente, concluyen que las enzimas que producen la mayor cantidad de péptidos con acción biológica corresponden a la tripsina y la quimotripsina.

Asimismo, la investigación realizada por [23] se centró en la digestión *in silico* de la α S1-caseína y la β -caseína de *C. hircus*. Los datos obtenidos muestran frecuencias relativas porcentuales de 44.86 % y 46.85 % referente a la liberación de inhibidores de ACE, 61.21 % y 81.53 % frente a la liberación de inhibidores de DPP4, y 11.6 % y 6.73 % referente a péptidos antioxidantes. Pese a que los resultados difieren levemente de los valores de frecuencias relativas porcentuales determinadas en este estudio, se destacan, al igual que en la presente investigación, a la β -caseína y la α S1-caseína de *C. hircus* como una potencial fuente de péptidos inhibidores de DPP4 con una mayor producción frente a los inhibidores de ACE.

En general, el estudio de los derivados bioactivos de la proteólisis de la leche se lleva a cabo mediante un amplio rango de proteasas que, en su mayoría, no están presentes en el sistema digestivo humano; por este motivo, los estudios *in silico* que emplean enzimas proteolíticas humanas son escasos. Complementario a la investigación por simulación computacional, [24] identificó, mediante experimentación *in vitro* con enzimas digestivas, una elevada presencia de péptidos antioxidantes e inhibidores de ACE. Por otra parte, afirma que los polimorfismos en los sustratos afectan los PBA derivados de la digestión. De forma similar [25] compararon los productos bioactivos de los derivados lácteos de bovino, oveja y cabra mediante experimentación *in vitro* empleando enzimas digestivas. Al igual que en la presente investigación, los resultados mostraron que, a pesar de las variaciones en los PBA y el distinto grado de homología entre las isoformas de las especies, no hay una diferencia estadísticamente significativa en la concentración de PBA liberados, además, se identificó que independiente al origen de la proteína, todas presentaron una alta concentración en solución de PBA inhibidores de ACE.

3.6 Análisis de medias y análisis de varianza para los valores de frecuencia media

La evaluación de frecuencia media permite realizar una comparación cuantitativa entre los cuatro tipos de leche. De forma semejante a lo que se evidenció en la evaluación de la frecuencia relativa porcentual, el análisis de varianza de un solo factor ($p > 0.05$) y el análisis de medias (<HSD) permitieron concluir que no existe una diferencia significativa entre las frecuencias medias de liberación de PBA durante la digestión del conjunto total de proteínas presentes en la leche de bovino (*Bos taurus*), oveja (*Ovis aries*), cabra (*Capra hircus*) y búfalo (*Bubalus bubalis*).

3.7 Evaluación de los valores de frecuencia media de liberación de PBA

La Figura 6 presenta las once clases de PBA obtenidos y su respectiva frecuencia media calculada a partir de (3). Los PBA estimulantes actúan a través de una serie de mecanismos dependientes de la secuencia de los mismos, entre ellos se ubican el aumento de la absorción de glucosa en tejidos musculares y el aumento de liberación de sustancias vasoactivas [26].

Los PBA inhibidores de Renina actúan mediante la alteración del eje hormonal Renina-Angiotensina-Aldosterona; siendo así, la inhibición de la Renina suprime la acción de la Angiotensina-II reduciendo sus efectos en el aumento de la presión sistémica [27].

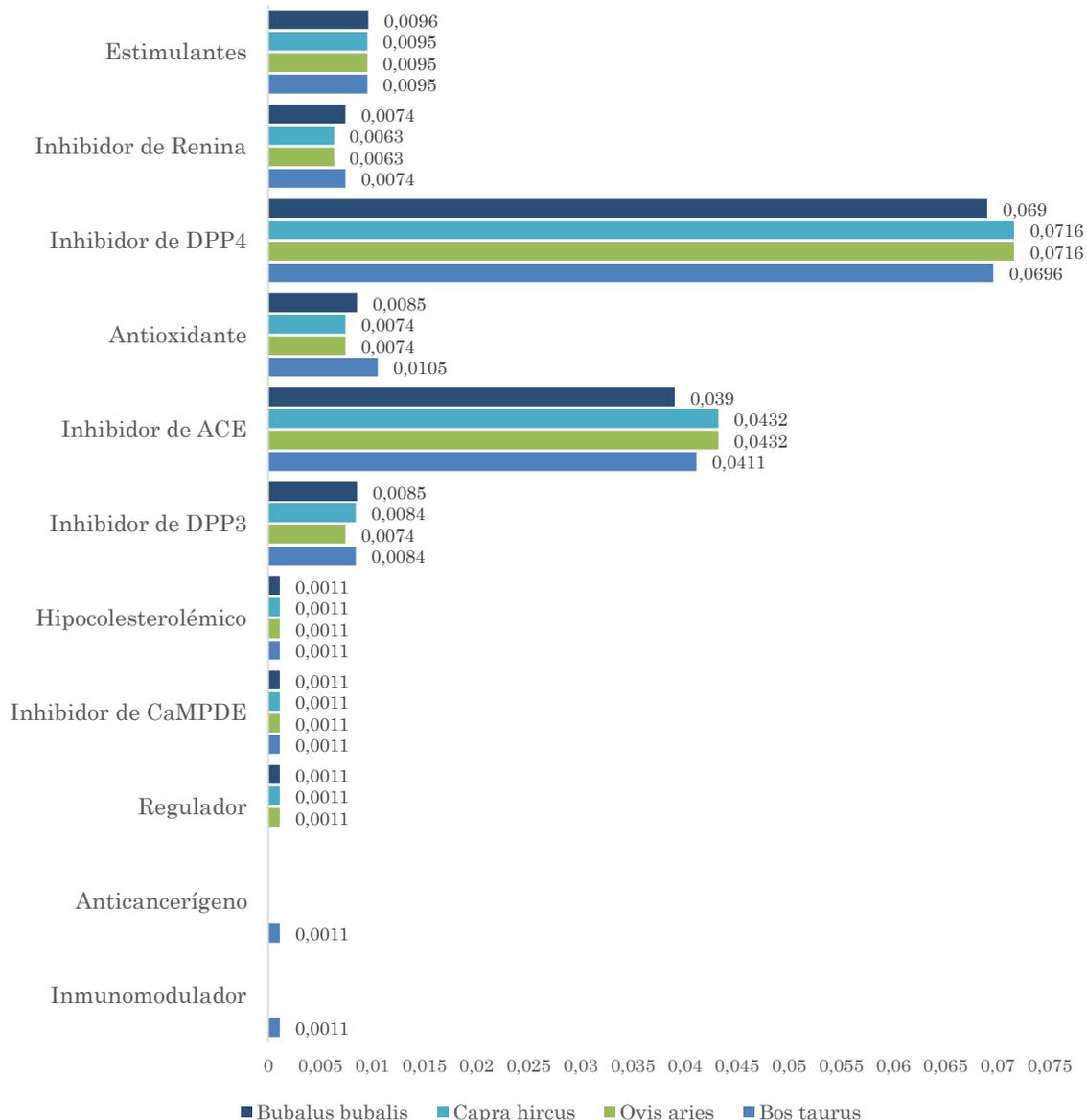


Figura 6. Frecuencia media de PBA obtenidos de la digestión de las proteínas presentes en la leche de cada especie. La evaluación estadística presenta un valor de $p > 0.05$ en los análisis de varianza y de medias.
Fuente: elaboración propia.

Los PBA inhibidores de DPP4, como su nombre lo indica, inhiben la acción catalítica de la enzima Dipeptidil Peptidasa-4 [28]. Los PBA antioxidantes se asocian a diferentes mecanismos mediante los cuales ejercen su función protectora, entre ellas se encuentran: la inhibición de la peroxidación lipídica, activación de la vía Nrf2 y la inducción de enzimas antioxidantes [29]. Los PBA inhibidores de ACE reducen la actividad catalítica de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ACE), por esta razón, ejercen un efecto regulador en la presión sanguínea [30]. Los PBA inhibidores de DPP3, de forma similar a los inhibidores de DPP4, suprimen la acción de la Dipeptidil Peptidasa-3 y, consecuentemente, inducen respuestas favorables en términos de hemodinámica [31]. Los PBA hipocolesterolémicos tienen efectos reductores sobre los niveles de colesterol sanguíneo [32]. Los PBA inhibidores de CaMPDE (Fosfodiesterasa dependiente de Calmodulina) inhiben la respectiva enzima en vías de señalización intracelular [33]. Los PBA reguladores, particularmente el dipéptido con secuencia DY (ver Tabla 5), tienen una función reguladora de flujo iónico a través de sistemas de membranas [34]. En las clasificaciones de PBA con carácter anticancerígeno e inmunomodulador se encuentra únicamente un péptido, PGPIP (ver Tabla 3), el cual ha sido aislado *in vitro* y se ha determinado su acción antitumoral e inmunomoduladora [35].

Adicionalmente, se destaca que la mayor parte de los PBA son dipéptidos; siendo así, estos son fácilmente absorbidos por transportadores de tipo SLC15A1 sin ser previamente hidrolizados por acción de endopeptidasas o aminopeptidasas presentes en las microvellosidades de los enterocitos [36].

Los resultados muestran, para las proteínas de la leche de las cuatro especies, una mayor frecuencia media de liberación de PBA con carácter inhibidor de DPP4. Seguido a esto, la producción de PBA con acción inhibitoria de ACE presenta la segunda frecuencia media más elevada para las cuatro especies. Los PBA estimulantes, inhibidores de Renina, inhibidores de DPP3 y antioxidantes presentan una frecuencia media considerable cuyo mayor valor, entre las cuatro especies, corresponde a: búfalo, bovino y búfalo por igual, bovino, y búfalo, respectivamente. Los PBA con acción hipocolesterolémica, inhibitoria de CaMPDE y reguladora tienen una frecuencia media relativamente baja en comparación con los demás PBA. Las proteínas de la leche de bovino no muestran producción de péptidos reguladores al ser sometidas a digestión. Los PBA con acción anticancerígena e inmunomoduladora se obtienen únicamente de la digestión de proteínas de la leche de bovino, sin embargo, presentan una frecuencia considerablemente baja.

En concordancia con la presente investigación, diversos estudios afirman que las proteínas presentes en la leche son una potencial fuente de dipéptidos y tripéptidos con acción biológica; la α -lactoalbúmina, κ -caseína y la β -caseína de la leche de bovino fueron reportadas en estudios *in silico* e *in vitro* como proteínas precursoras de un gran número de derivados peptídicos bioactivos [37], [38]. Estas proteínas, junto a la α S1-caseína y a la β -lactoglobulina del bovino, fueron blanco de estudios donde se determinó, al igual que en la presente investigación, una producción elevada de PBA con potencial inhibitorio de DPP4 [39]-[41].

3.8 Comparación de PBA derivados de las isoformas presentes en la leche de bovino, oveja, cabra y búfalo

Los resultados de la investigación muestran un perfil de PBA para cada tipo de leche, donde los valores máximos de cantidad y frecuencia por cada clase de péptido se encuentran distribuidos de la siguiente forma: 9 péptidos estimulantes para las cuatro especies y una frecuencia media levemente mayor para el búfalo con un valor 0.096, 7 péptidos inhibidores de Renina con una frecuencia media de 0.0074 para el bovino y el búfalo, 68 péptidos inhibidores de DPP4 con una frecuencia media de 0.0716 para la cabra y la oveja, 10 péptidos

antioxidantes con una frecuencia media de 0.0105 para el bovino, 41 péptidos inhibidores de ACE con una frecuencia media de 0.0432 para la cabra y la oveja, 8 péptidos inhibidores de DPP3 para el bovino, la cabra y el búfalo, este último con una frecuencia media levemente mayor con un valor de 0.0085. Se obtuvo 1 péptido con acción hipocolesterolémica y 1 péptido inhibidor de CaMPDE a partir de la β -lactoglobulina de las cuatro especies. Se evidencia la producción de 1 péptido regulador obtenido de la leche de búfalo, cabra y oveja únicamente. Finalmente, se obtuvo 1 péptido con acción inmunomoduladora y anticancerígena, este, como se mencionó anteriormente, fue producto de la digestión de la β -caseína del bovino.

Los estudios referentes a PBA producidos mediante hidrólisis catalizada por enzimas presentes en organismo humano se han centrado en la leche de bovino debido a su elevado porcentaje de consumo a nivel mundial. Se han reportado investigaciones donde se evalúa el potencial productor de PBA de las proteínas de la leche de búfalo, camello, cabra, oveja, yegua y yak [42] donde se obtuvo péptidos opioides, inhibidores de ACE, antitrombóticos, citotóxicos, entre otros. Sin embargo, el proceso de proteólisis fue llevado a cabo por enzimas ajenas al sistema digestivo humano.

Recientemente se ha destacado la leche de especies como la oveja, la cabra y el búfalo como un nutriente viable que sustituye la leche bovina [43]-[45]. Por este motivo, resulta pertinente una evaluación comparativa del perfil de PBA obtenidos de las proteínas de leche de bovino, oveja, cabra y búfalo.

Diferentes investigaciones han evaluado los PBA obtenidos de las isoformas de cada especie de forma particular. En [46] concluyen que los péptidos derivados de la β -caseína y las α -caseínas de la leche de cabra inducen una mejoría en la resistencia a la insulina. Por su parte, en [47] demostraron que los polimorfismos en la α S1-caseína del búfalo afectaban el proceso de digestión, y consecuentemente los PBA liberados. De forma similar a los resultados de esta investigación, se halló un porcentaje considerable de PBA con acción inhibitoria de ACE. [48] determinaron, a partir de experimentación *in vitro*, un elevado número de PBA con acción inhibidora de ACE producto de la hidrólisis de proteínas de la leche de oveja.

3.9 Aplicación de proteínas de la leche como potencial fuente de administración de moléculas con efecto terapéutico

Entre los diversos ámbitos de relevancia de los PBA, se destaca su interacción con la DPP4. La Dipeptidil Peptidasa-4 (DPP4) es una enzima de tipo serin-proteasa que puede hallarse en forma soluble en el plasma sanguíneo conservando su acción catalítica de proteólisis [49]. Esta enzima hidroliza oligopéptidos presentes en la sangre y líquidos intersticiales; por tal motivo, esta proteína ha sido blanco de investigación en el diseño de moléculas inhibitorias que contrarresten su acción de degradación [50]. Los fármacos inhibidores de DPP4 son una opción terapéutica en pacientes con Diabetes Mellitus Tipo 2, esto debido a su acción supresora en el proceso de degradación de péptidos hipoglucemiantes como GLP-1 y GIP, asociados al efecto incretina [51]. El uso de inhibidores de DPP4 en el manejo de pacientes diabéticos permite evadir los riesgos asociados a otras formas de regulación glicémica [52].

Adicional al manejo homeostático de la glucosa, se ha destacado un efecto protector sobre el sistema cardiovascular y renal por parte de estas moléculas [53], principalmente mediante propiedades antihipertensivas y antiinflamatorias [54], [55], [56] plantean que el consumo de alimentos con proteínas precursoras de inhibidores de DPP4, como las proteínas en la carne de cerdo, pueden ser un complemento dietario en paciente con alteraciones en la regulación de la glicemia. De forma similar, la ingestión de extractos proteicos de la leche sugiere un mecanismo de administración enteral de inhibidores de DPP4 [57], no obstante, se requiere

una evaluación detallada de la efectividad y los mecanismos de acción *in vivo* que quedan sujetos a futuros estudios e investigaciones.

4 CONCLUSIONES

Las caseínas y seroproteínas presentes en la leche de bovino, oveja, cabra y búfalo muestran grados de homología distintos. Consecuentemente, al ser hidrolizadas por acción simultánea de la pepsina, tripsina y quimotripsina se observan diferentes puntos de clivaje y productos de digestión.

A partir de simulación proteolítica en BIOPEP-UWM es posible evidenciar once clases de PBA: estimulantes, inhibidores de Renina, inhibidores de DPP4, antioxidantes, inhibidores de ACE, inhibidores de DPP3, hipocolesterolémicos, inhibidores de CaMPDE, reguladores, anticancerígenos e inmunomoduladores. Cada clase de PBA se produce en frecuencias variables dependientes de la isoforma. Los PBA inhibidores de DPP4 presentan la mayor frecuencia de liberación en las cuatro especies.

Pese a la diferencia en los valores de frecuencia, los cuatro perfiles totales de PBA correspondientes a la leche de cada especie no muestran una diferencia significativa ($p > 0.05$). El grado de inhibición o estimulación *in vivo*, así como el efecto terapéutico de cada PBA producto de la digestión de las proteínas de la leche, está sujeto a futuros estudios e investigaciones.

5 AGRADECIMIENTOS

Jorge A. Barrero agradece a los docentes del Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia por su compromiso con incentivar el interés por la investigación científica.

Este artículo no cuenta con financiación.

CONTRIBUCIONES

Jorge A. Barrero: Planteamiento de la investigación. Desarrollo de análisis de resultados, discusión de las aplicaciones de la investigación en péptidos bioactivos y conclusiones.

Claudia M. Cruz: Colaboración en el planteamiento de la investigación y aplicación de conocimientos en procesos *in silico* y quimiinformáticos. Desarrollo de introducción y metodología.

Jenny A. Casallas: Conceptualización de la composición química de la leche y proteínas lácteas. Colaboración en el desarrollo de metodología y análisis de resultados.

Juan S. Vásquez: Implementación de bases bioinformáticas para la realización de estudios relacionados a la caracterización de péptidos bioactivos. Colaboración en el desarrollo de introducción y metodología.

CONFLICTOS DE INTERÉS

No hay conflicto de interés que declarar por parte de los autores.

6. REFERENCIAS

- [1] A. S. Wiley, “The Evolution of Lactase Persistence: Milk Consumption, Insulin-Like Growth Factor I, and Human Life-History Parameters,” *Q. Rev. Biol.*, vol. 93, no. 4, pp. 319-345, Dec. 2018. <https://doi.org/10.1086/700768>
- [2] S. Singhal; R. D. Baker; S. S. Baker, “A Comparison of the Nutritional Value of Cow’s Milk and Nondairy Beverages,” *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 64, no. 5, pp. 799-805, Apr. 2017. <https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001380>
- [3] S. Gerosa; J. Skoet, “Milk availability trends in production and demand and medium-term outlook,” Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. Rome, Italy, 2012. <https://doi.org/10.22004/ag.econ.289000>
- [4] R. Pietrzak-Fiećko; A. M. Kamelska-Sadowska, “The Comparison of Nutritional Value of Human Milk with Other Mammals’ Milk,” *Nutrients*, vol. 12, no. 5, pp. 1404, May. 2020. <https://doi.org/10.3390/nu12051404>
- [5] S. B. Dergal, “Leche,” in *Química de los alimentos*, 4th ed. Distrito Federal: Pearson Educación, pp. 603-629. 2006.
- [6] E. Vargas-Bello-Pérez; R. I. Márquez-Hernández; L. E. Hernández-Castellano, “Bioactive peptides from milk: animal determinants and their implications in human health,” *J. Dairy Res*, vol. 86, no. 2, pp. 136–144, Jun. 2019. <https://doi.org/10.1017/S0022029919000384>
- [7] E.B.-M. Daliri; D.H. Oh; B.H. Lee, “Bioactive Peptides,” *Foods*, vol. 6, no. 5, Apr. 2017. <https://doi.org/10.3390/foods6050032>
- [8] S. D. Nielsen; R. L. Beverly; Y. Qu; D. C. Dallas, “Milk bioactive peptide database: A comprehensive database of milk protein-derived bioactive peptides and novel visualization,” *Food Chem.*, vol. 232, pp. 673-682. Apr. 2017.
- [9] Y. Wada; B. Lönnerdal, “Bioactive peptides released from in vitro digestion of human milk with or without pasteurization,” *Pediatr. Res.*, vol. 77, no. 4, pp. 546–553. Jan. 2015. <https://doi.org/10.1038/pr.2015.10>
- [10] M. Tu; S. Cheng; W. Lu; M. Du, “Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions,” *Trends Anal. Chem.*, vol. 105, pp. 7-17. Aug. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.04.005>
- [11] M. Barati *et al.*, “An *in silico* model to predict and estimate digestion-resistant and bioactive peptide content of dairy products: A primarily study of a time-saving and affordable method for practical research purposes,” *LWT*, vol. 130. Aug. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109616>
- [12] C. Acquah; Y. W. Chan; S. Pa; D. Ageyi; C. C. Udenigwe, “Structure-informed separation of bioactive peptides,” *J. Food Biochem.*, vol. 43, no. 1. 2019. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12765>
- [13] R. J. Fitz Gerald; M. Cermeño; M. Khalesi; T. Kleekayai; M. Amigo-Benavent, “Application of in silico approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides,” *J. Funct. Foods*, vol. 64. Jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103636>
- [14] F. Pazos; M. Chagoyen. *Practical protein bioinformatics*, 1 ed. New York: Springer International, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12727-9>
- [15] S. Choudhuri, *Bioinformatics for beginners: Genes, genomes, molecular evolution, databases and analytical tools*, 1 ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-07153-0>
- [16] P. Minkiewicz; A. Iwaniak; M. Darewicz, “BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 23, Nov. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20235978>
- [17] E. Gasteiger; C. Hoogland; A. Gattiker; S. Duvaud; M. R. Wilkins; R. D. Appel; A. Bairoch, “Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server,” *The Proteomics Protocols Handbook. Springer Protocols Handbooks*, Walker J.M. (eds), pp. 571-607, 2005. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- [18] B. Keil, *Specificity of proteolysis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992.
- [19] F. Sievers *et al.*, “Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega,” *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 539, Jan. 2011. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>
- [20] Y. Dekel *et al.*, “Dispersal of an ancient retroposon in the TP53 promoter of Bovidae: Phylogeny, novel mechanisms, and potential implications for cow milk persistency,” *BMC Genom.*, vol. 16, no. 1, pp. 53, Feb. 2015. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1235-8>
- [21] K. Chikuni; Y. Mori; T. Tabata; M. Saito; M. Monma; M. Kosugiyama, “Molecular phylogeny based on the κ-casein and cytochrome b sequences in the mammalian suborder Ruminantia,” *J. Mol. Evol.*, vol. 41, no.6, pp. 859-866, Dec. 1995. <https://doi.org/10.1007/BF00173165>
- [22] M. Dziuba; B. Dziuba; A. Iwaniak, “Milk proteins as precursors of bioactive peptides,” *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, vol. 8, no. 1, pp. 71-90, 2009. <https://www.food.actapol.net/volume8/issue1/abstract-7.html>

- [23] S. Rani; K. Pooja; G. Pal, "Exploration of potential angiotensin converting enzyme inhibitory peptides generated from enzymatic hydrolysis of goat milk proteins," *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, vol. 11, pp. 83-88. Jul. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2017.06.008>
- [24] S. Li *et al.*, "Formation of bioactive peptides during simulated gastrointestinal digestion is affected by α_1 -casein polymorphism in buffalo milk," *Food Chem.*, vol. 313, May. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126159>
- [25] H. Nguyen; J. Gathercole; L. Day; J. Dalziel, "Differences in peptide generation following in vitro gastrointestinal digestion of yogurt and milk from cow, sheep and goat," *Food Chem.*, vol. 317. Jul. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126419>
- [26] M. Morifuji; J. Koga; K. Kawanaka; M. Higuchi, "Branched-chain amino acid-containing dipeptides, identified from whey protein hydrolysates, stimulate glucose uptake in L6 myotubes and isolated skeletal muscles," *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, vol. 55, pp. 81-86, 2009. <https://doi.org/10.3177/jnsv.55.81>
- [27] C. C. Udenigwe; R. E. Aluko, "Food Protein-Derived Bioactive Peptides: Production, Processing, and Potential Health Benefits," *J. Food Sci.*, vol. 77, no. 1, Nov. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
- [28] A. Iwaniak; D. Mogut, "Metabolic Syndrome-Preventive Peptides Derived from Milk Proteins and Their Presence in Cheeses: A Review," *Appl. Sci.*, vol. 10, no. 8, pp. 2772, Apr. 2020. <https://doi.org/10.3390/app10082772>
- [29] F. Tonolo *et al.*, "Milk-derived bioactive peptides exhibit antioxidant activity through the Keap1-Nrf2 signaling pathway," *J. Funct. Foods*, vol. 64, Jan. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103696>
- [30] Q. Yousafi *et al.*, "In Silico Evaluation of Food Derived Bioactive Peptides as Inhibitors of Angiotensin Converting Enzyme (ACE)," *Int. J. Pept. Res. Ther.*, Jun. 2020. <https://doi.org/10.1007/s10989-020-10090-y>
- [31] B. Deniau *et al.*, "Circulating dipeptidyl peptidase 3 is a myocardial depressant factor: dipeptidyl peptidase 3 inhibition rapidly and sustainably improves haemodynamics." *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 22, no. 2, pp. 290-299, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1002/ejhf.1601>
- [32] Z. Karami; B. Akbari-adergani, "Bioactive food derived peptides: a review on correlation between structure of bioactive peptides and their functional properties," *J. Food Sci. Technol.*, vol. 56, pp. 535-547, 2019. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3549-4>
- [33] I. D. Nwachukwu; A. M. Alashi; P. C. Zahradka; R. E. Aluko, "Transport, Bioavailability, Safety, and Calmodulin-Dependent-Phosphodiesterase-Inhibitory Properties of Flaxseed-Derived Bioactive Peptides," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, no. 5, pp. 1429-1436, 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06299>
- [34] D. A. Ignat'ev; V. V. Vorob'ev; R. K. Ziganshin, "Effects of a number of short peptides isolated from the brain of the hibernating ground squirrel on the eeg and behavior in rats," *Neurosci. Behav. Physiol.*, vol. 28, no. 2, pp. 158-166, Mar. 1998. <https://doi.org/10.1007/bf02461962>
- [35] W. Wang *et al.*, "PGPIP, a Therapeutic Hexapeptide, Suppressed Human Ovarian Cancer Growth by Targeting BCL2," *Plos ONE*, vol. 8, no. 4, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060701>
- [36] U. Hopfer, "Digestion and Absorption of Basic Nutritional Constituents" in *Textbook of Biochemistry with clinical correlations*, 7ed. New York: J. Wiley & Sons, 2011, pp. 1043-1049
- [37] H. Punia *et al.*, "Identification and Detection of Bioactive Peptides in Milk and Dairy Products: Remarks about Agro-Foods," *Molecules*, vol. 25, no. 15, pp. 3328, Jul. 2020. <https://doi.org/10.3390/molecules25153328>
- [38] A. B. Nongonierma; R. J. FitzGerald, "Enhancing bioactive peptide release and identification using targeted enzymatic hydrolysis of milk proteins," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, pp. 3407-3423. 2018. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0793-9>
- [39] A. B. Nongonierma; C. Mooney; D. C. Shields; R. J. Fitzgerald, "In silico approaches to predict the potential of milk protein-derived peptides as dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitors," *Peptides*, vol. 57, pp. 43-51, Jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.04.018>
- [40] A. B. Nongonierma; M. Lalmahomed; S. Paoella; R. J. Fitzgerald, "Milk protein isolate (MPI) as a source of dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory peptides," *Food Chem.*, vol. 231, pp. 202-211, Sep. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.03.123>
- [41] I. Lacroix; X. Chen; D. Kitts; E. Li-Chan, "Investigation into the bioavailability of milk protein-derived peptides with dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity using Caco-2 cell monolayers," *Food Funct.*, vol. 8, no. 2, pp. 701-709. Jan. 2017. <https://doi.org/10.1039/C6FO01411A>
- [42] M. H. El-Salam; S. El-Shibiny, "Bioactive Peptides of Buffalo, Camel, Goat, Sheep, Mare, and Yak Milks and Milk Products," *Food Rev. Int.*, vol. 29, no. 1, pp. 1-23, Sep. 2012. <https://doi.org/10.1080/87559129.2012.692137>
- [43] A. Mohapatra; A. K. Shinde; R. Singh, "Sheep milk: A pertinent functional food," *Small Ruminant Res.*, vol. 181, pp. 6-11, Dec. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.10.002>
- [44] S. Stergiadis; N. P. Nørskov; S. Purup; I. Givens; M. R. Lee, "Comparative Nutrient Profiling of Retail Goat and Cow Milk," *Nutrients*, vol. 11, no. 10, pp. 2282, Sep. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11102282>

- [45] N. D'Onofrio *et al.*, "Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Buffalo Milk δ -Valerobetaine," *J. Agric. Food Chem.*, vol. 67, no. 6, pp. 1702-1710, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b07166>
- [46] H. Gong *et al.*, "Identification of novel peptides from goat milk casein that ameliorate high-glucose-induced insulin resistance in HepG2 cells," *J. Dairy Sci.*, vol. 103, no. 6, pp. 4907-4918, Jun. 2020. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17513>
- [47] S. Li *et al.*, "Formation of bioactive peptides during simulated gastrointestinal digestion is affected by α 1-casein polymorphism in buffalo milk," *Food Chem.*, vol. 313, May. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126159>
- [48] D. Tagliazucchi; S. Martini; S. Shamsia; A. Helal; A. Conte, "Biological activities and peptidomic profile of in vitro-digested cow, camel, goat and sheep milk," *Int. Dairy J.*, vol. 81, pp. 19-27, Jun. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2018.01.014>
- [49] L. L. Baggio *et al.*, "Plasma levels of DPP4 activity and sDPP4 are dissociated from inflammation in mice and humans," *Nature*, vol. 11, pp. 3766, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17556-z>
- [50] E. E. Mulvihill; D. J. Drucker, "Pharmacology, physiology and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors," *Endocr. Rev.* vol. 35, no. 6, pp. 992-1019, Dec. 2014. <https://doi.org/10.1210/er.2014-1035>
- [51] C. F. Deacon, "Metabolism of GIP and the contribution of GIP to the glucose-lowering properties of DPP-4 inhibitors," *Peptides*, vol. 125, Mar. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2019.170196>
- [52] G. Sesti *et al.*, "Ten years of experience with DPP-4 inhibitors for the treatment of type 2 diabetes mellitus," *Acta Diabetol.*, vol. 56, pp. 605-617, Jan. 2019. <https://doi.org/10.1007/s00592-018-1271-3>
- [53] K. Tomovic; J. Lazarevic; G. Kocic; M. Deljanin-Ilic; M. Anderluh; A. Smelcerovic, "Mechanisms and pathways of anti-inflammatory activity of DPP-4 inhibitors in cardiovascular and renal protection," *Med. Res. Rev.*, vol. 39, no. 1, pp. 404-422, May. 2018. <https://doi.org/10.1002/med.21513>
- [54] J. Zhang; Q. Chen; J. Zhong; J. Zhong; C. Liu; B. Zheng; Q. Gong, "DPP-4 Inhibitors as Potential Candidates for Antihypertensive Therapy: Improving Vascular Inflammation and Assisting the Action of Traditional Antihypertensive Drugs," *Front. Immunol.*, vol. 10, May. 2019. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01050>
- [55] M. Anderluh; G. Kocic; K. Tomovic; H. Kocic; A. Smelcerovic, "DPP-4 inhibition: A novel therapeutic approach to the treatment of pulmonary hypertension?" *Pharmacol. Therapeut.*, vol. 201, pp. 1-7, Sep. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2019.05.007>
- [56] P. Kęska; J. Stadnik; O. Bąk; P. Borowski, "Meat Proteins as Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors and Glucose Uptake Stimulating Peptides for the Management of a Type 2 Diabetes Mellitus In Silico Study," *Nutrients*, vol. 11, no. 10, Oct. 2019. <https://doi.org/10.3390/nu11102537>
- [57] M.I. El-Sayed; S. Awad; A. Whaba; A. El Attar; M.I. Yousef; M. Zedan, "In Vivo Anti-diabetic and Biological Activities of Milk Protein and Milk Protein Hydrolyaste.," *Adv. Dairy Res.*, vol. 4, no. 2. 2016. <https://doi.org/10.4172/2329-888X.1000154>