

EVALUACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE GLICOPROTEÍNA DE GLÁNDULAS SUBMAXILARES DE BOVINO

Recibido para publicación: 27/03/2007

Aprobado para publicación: 08/07/2007

Marvic Herrera Od(1), Fernando Lalaguna PhD(2), Yanira Infante, Lic(1), Ana María Acevedo PhD(1)

(1)Odontólogo. Profesora Agregado, Instituto de Investigaciones Odontológicas "Raúl Vicentelli", Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

(2)Fernando Lalaguna. MSc. PhD. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas, Venezuela.

(1)Yanira Infante. Lic. Química, Tecnólogo Químico, Instituto de Investigaciones Odontológicas "Raúl Vicentelli", Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

(1)Ana María Acevedo. MSc. PhD. Profesora Titular, Instituto de Investigaciones Odontológicas "Raúl Vicentelli", Facultad de Odontología, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Autor de Correspondencia:

Profa. Marvic Herrera. Unidad de Saliva Artificial, Lab. de Saliva
Instituto de Investigaciones Odontológicas Raúl Vicentelli. Facultad de Odontología, UCV
Correo electrónico: marvicherrera@yahoo.com. Tlf: 6053868

RESUMEN

Los métodos utilizados para la obtención de glicoproteínas de glándulas submaxilares de bovino consisten en esquemas que implican la eliminación de compuestos acuinosolubles, aislamiento y purificación de las glicoproteínas. El propósito de este estudio fue evaluar un método de obtención de glicoproteínas (Escalona y col. 1989) a partir de glándulas de bovino para obtener un extracto mucínico destinado a la elaboración de un sustituto salival, con el fin de conocer el tipo y cantidad de proteínas presentes y su asociación con la viscosidad. Se analizaron 6 fases acuosas posteriores a la primera centrifugación. De cada una de las fases acuosas se tomó una alícuota y se determinó la cantidad de proteínas totales, y la viscosidad. La viscosidad aparente se midió con un viscosímetro Marca Brookfield modelo LVT con un eje N°4 a una velocidad de desplazamiento a 73.42seg^{-1} , y las proteínas se caracterizaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 8%. Cada uno de los geles se escaneó y la densitometría se realizó en forma computarizada (un programa MultiAnalyst™ /PC -Bio Rad- Versión 1.1). Se observó que a medida que se avanzaba en el esquema de extracción de glicoproteínas disminuía la cantidad de proteínas totales, el patrón electroforético mostró diferencias cualitativas entre las muestras evaluadas lo cual se reflejó en una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) de la viscosidad aparente. Al expresar la viscosidad con relación al contenido proteico ésta aumentaba, lo que nos permitió inferir que a pesar que hubo una pérdida de proteínas se preservaron las glicoproteínas viscosas a expensa del rendimiento proteico.

Palabras Clave: mucina, sustituto salival, proteínas salivales, glándulas submaxilares

ABSTRACT

For the obtainment of glycoproteins from bovine submaxillary glands methods are used that encompass the elimination of insoluble compounds, and fractionation and purification procedures. This study was designed to evaluate a particular method (Escalona et al. 1989) for the obtainment of glycoprotein to be used in the preparation of a salivary substitute, and aimed to gathering information on the type and amount of present proteins and their association with viscosity. For this purpose, the six aqueous phases following a centrifugation step in the fractionation scheme were analyzed for protein content (Lowry et al 1951), aparent viscosity (Brookfield viscometer, model LVT), and 8% SDS-PAGE electrophoresis with electronic processing of the densitograms (Bio-Rad/multi Analyst). The protein content, aparent viscosity (statistically significant $P < 0.05$), and number of electrophoretic bands showed a decrease with the progress of the fractionation procedure. However, when aparent visxosity was ex pressed in terms of protein content it showed an increase, which is consonous with the relative enrichmentain of the fractions glycoprotein along the purification procedure.

Key Words: mucin, salivary substitute, salivary proteins, submaxillary glands

INTRODUCCIÓN

Los eventos biológicos y físicos generados en la cavidad bucal son condicionados fuertemente por las glicoproteínas salivales, por lo cual estos componentes son de importancia a la hora de elaborar un sustituto salival (Oemrawsing y col. 1974). Los sustitutos salivales son fórmulas destinadas a imitar las características químicas y físicas de la saliva humana. Apoyado en esto, diversos autores han desarrollado métodos de extracción de glicoproteínas provenientes de glándulas submaxilares de bovino (GSB) con el fin de elaborar sustitutos salivales.

Draus y Leung (1960), reportaron un método de obtención de glicoproteínas provenientes de GSB, a objeto de caracterizarla fisicoquímicamente. Posteriormente, Shellis en (1978), modificó el procedimiento de Draus y Leung. (1960) para obtener glicoproteínas salivales destinadas a la preparación de una saliva artificial para llevar a cabo estudios *in vitro* relacionados a la formación de placa dental. Basándose en los estudios anteriores S-Gravenmade y col. (1974), prepararon una saliva artificial a base de GSB para el tratamiento paliativo de boca seca en pacientes con xerostomía severa. En 1989 Escalona y col., en Venezuela, elaboraron un sustituto salival utilizando glicoproteínas provenientes de GSB y extraídas mediante una combinación de los métodos reportados por Draus y Leung (1960) y Shellis (1978).

El extracto proteico preparado por Escalona y col. (1989), ha sido el punto de partida para diversos estudios realizados en la Facultad de Odontología U.C.V. En 1996 Herrera y col. estudiaron la variación de la viscosidad del extracto proteico en relación con el pH, concentración de proteína y tratamiento térmico. Los resultados mostraron una relación sigmoidal entre la viscosidad y el pH, así como, también una relación lineal entre la viscosidad y la concentración de glicoproteínas.

Los requerimientos tecnológicos para la fabricación de un sustituto salival y los condicionantes clínicos del uso del mismo han determinado la necesidad de evaluar el método de obtención de las glicoproteínas. Por lo tanto, para darle continuidad a los estudios de composición/función de la solución glicoproteica preparada en la Facultad de Odontología de la UCV en este estudio nos orientamos a evaluar el método de obtención de estas macromoléculas con miras a un ajuste y a una simplificación de los procedimientos. Por lo tanto, el propósito de este estudio fue evaluar un método de obtención de glicoproteínas provenientes de GSB cuyo producto final es un extracto mucínico destinado a la elaboración de un sustituto salival.

MATERIALES Y MÉTODOS

Procesamiento de las glándulas submaxilares de bovino y extracción de las glicoproteínas:

Para el procesamiento de las glándulas de origen bovino se aplicó el método descrito por Escalona y col (1989); este método consiste en un esquema de fraccionamiento para la obtención de glicoproteínas solubles provenientes de las glándulas submaxilares del bovino. La evaluación del esquema del método utilizado condujo a la separación de una serie de fases intermedias de composición distinta, debido a que los tratamientos aplicados implican la separación y descarte de algún componente presente inicialmente.

Selección de Fases del esquema de fraccionamiento:

El criterio empleado para seleccionar las fases del esquema de fraccionamiento sobre las que se realizaron las medidas experimentales, fue trabajar con los sobrenadantes obtenidas después de cada proceso de centrifugación.

La Fase I, surgió después de la primera centrifugación a 3.000 rpm durante 20 min; de este proceso se obtuvo un precipitado (PPDO) y un sobrenadante (SN₁), el precipitado se resuspendió en una solución amortiguadora de fosfato (Sorensen) 0,01M a pH 7 y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones descritas anteriormente. Este procedimiento produjo otro PPDO el cual se descartó y otro sobrenadante (SN₂) que se mezcló con el SN₁, dando origen al sobrenadante total (SN_T) que se denominó Fase I. A esta Fase se le realizó una extracción clorofórmica durante 72 horas, y como producto de esta extracción se obtuvieron dos fases: una fase acuosa (FA₁) y una fase clorofórmica a la que se le agregó agua y NaCl con el objeto de realizar una segunda extracción. A partir de esta extracción se obtuvieron dos nuevas fases, una acuosa FA₂ que se mezcló con la FA₁ dando origen a FA_T y la fase clorofórmica que se descartó. A la fase (FA_T) se le realizó otra extracción con cloroformo la cual produjo una fase acuosa que se trató con ácido p-Toluensulfónico al 1% (p/v), previamente neutralizado con Hidróxido de sodio al 20%(p/v) a pH 7, a esta solución se le denominó Fase II. La Fase III, se obtuvo después del ajuste a pH 4 con ácido acético al 1% (v/v) de la Fase II. La Fase IV, se originó después de ajustada la fase III a pH 7 con hidróxido de amonio y finalmente la fase V y VI se obtuvieron después de dializada la solución durante 48 y 72 respectivamente.

Análisis Bioquímicos:

Determinación de Proteína

El contenido de proteína fue determinado por el método reportado por Lowry y col. (1951) utilizando un espectrofotómetro marca Beckman DU-65 a 750nm. Durante los análisis se realizaron los debidos correctivos por las interferencias producidas por los reactivos utilizados durante el esquema de fraccionamiento

Análisis electroforético y patrón densitométrico

Los análisis de electroforesis fueron realizados de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970). Las muestras fueron analizadas en geles de poliacrilamida SDS-PAGE al 8% En cada gel se colocó una muestra de saliva humana como patrón y un marcador de peso molecular de rango 10-220KDa (Benchmark). El gel fue teñido con Coomassie Brilliant Blue R-250 y

escaneado en un densitómetro GS-690nm Imagins densitometer, Transparency Frame 4200163 (Biorad).

Determinación de la viscosidad

Cada fase previamente ajustada a una concentración de proteína de 0,5% (p/v) se le determinó la viscosidad por triplicado. Las lecturas se realizaron a una temperatura ambiente promedio de 22°C en un viscosímetro marca Brokfield modelo LVT, con un eje N° 4 a una escala 1-10cps, a una velocidad constante de 60 rpm durante 5 minutos y una velocidad de desplazamiento de 73.42seg⁻¹.

Análisis Estadístico

Para evaluar la relación entre las dos variables estudiadas (cantidad de proteína y viscosidad) se seleccionaron los coeficientes de correlación no paramétricos de Tabú de Kendall y Rho de Sperman.

RESULTADOS

La tabla 1, muestra las características de las fases analizadas durante el proceso de fraccionamiento usado para obtener glicoproteínas de glándula submaxilar de bovino. Los resultados indicaron una eliminación de un 96% de las proteínas presentes en el extracto a lo largo del proceso de fraccionamiento; siendo esta reducción mas dramática entre la fase I y II (57,3%). La disminución del contenido proteico estuvo acompañada por un decrecimiento en la viscosidad aparente,

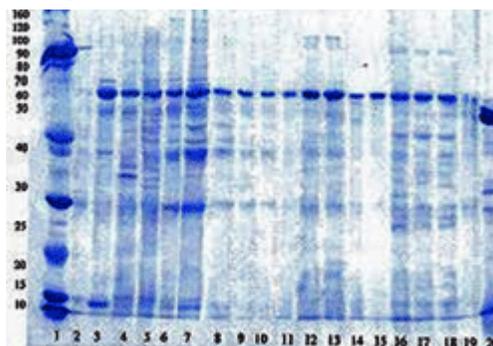
Tabla 1.
Características de las fases analizadas durante el proceso de fraccionamiento usado para obtener glicoproteínas de glándula submaxilar de bovino.

FASES EXPERIMENTALES	CANTIDAD DE PROTEÍNA (grs)	RENDIMIENTO (%)	DISMINUCIÓN (%)	VISCOSIDAD (CPS)
I	27,144	2,7	-	1,59±0,03
II	11,58	1,2	57,3	1,38±0,03
III	10,82	1,1	6,6	1,21±0,00
IV	9,62	1,0	11,1	1,26±0,00
V	7,52	0,8	21,8	1,21±0,00
VI	7,70	0,8	0,0	1,21±0,00

Los electroforetograma correspondiente a las fases experimentales estudiadas se observan en la Figura 1. En él se observan más de 12 bandas por cada fase evaluada, las cuales se observan bien definidas en un rango de PM entre 10-220KDa como lo establece el marcador de PM seleccionado.

Figura 1. Electroforetograma del Gel SDS-Page al 8%.

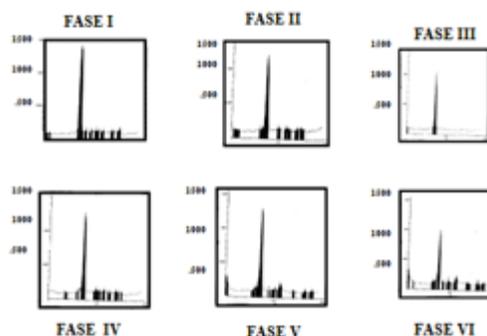
Fases seleccionadas del esquema de extracción de proteínas provenientes de glándulas submaxilares de bovino



Canales de corrida. 1-Marcador de Peso Molecular. 2-Saliva Humana, 5-Fase I, 8-Fase II, 9-Fase II, 10-Fase IV, 11-Fase V, 14-Fase VI

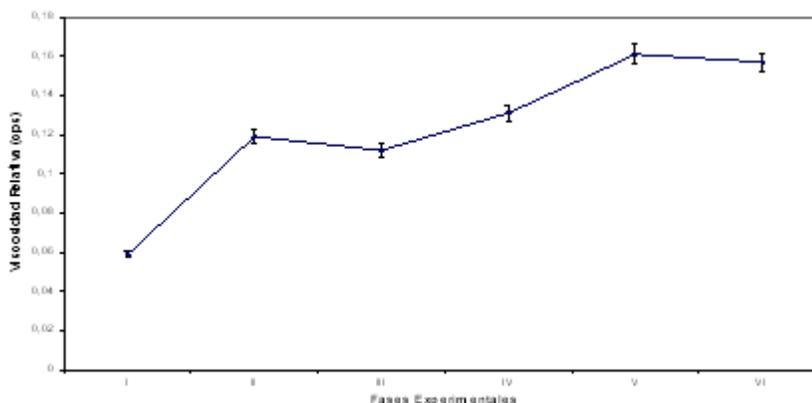
En la región media del gel se concentra el mayor número de bandas, las cuales oscilan en un rango de peso molecular entre 25 y 70KDa, lo que se evidenció en alrededor de 12 picos observados en los densitogramas mostrados en la figura 2.

Figura 2.
Densitogramas de las soluciones proteicas de las fases seleccionadas del esquema de extracción de proteínas provenientes de glándulas submaxilares de bovino.



En la figura 3, se observan las variaciones en la viscosidad aparente de las diferentes fases analizadas. Se aprecia una disminución de la viscosidad aparente a medida que disminuye el contenido proteico. El análisis estadístico indicaron que las variables en estudio presentaron una relación positiva ($r^2=0,7$) estadísticamente significativa ($p<0,05$).

Figura 3.
Variación de la viscosidad relativa en las diferentes fases durante el proceso de fraccionamiento



DISCUSIÓN

Los resultados muestran, una clara variación cuantitativa y cualitativa de los componentes proteicos (Tabla 1 y Figura 3) a medida que se avanza en el proceso de purificación, lo que podría explicarse por la remoción de proteínas durante el procesamiento. Se registró mayor contenido de proteínas en la fase I (27,1gr) ya que en esa fase el extracto se encontraba en

estado crudo y no fue sometido a ningún procedimiento que causara pérdida o eliminación de proteína. El rendimiento proteico en relación a la cantidad inicial de glándula fu de 2,7% lo que indica que ya en una etapa temprana del esquema utilizado, el rendimiento proteico es bajo.

La disminución de proteínas entre las fases I y II de debió a la pérdida de componentes durante los procesos de homogenización y centrifugación y a que probablemente algunas proteínas de interés quedaron en las fases descartadas, esto indica que a pesar de que en la fase I están presentes el total de las proteínas extraídas, en las subsiguientes etapas del procesamiento el esquema de purificación utilizado nos permite la recuperación de otras proteínas las cuales son determinantes para el mantenimiento de la viscosidad aparente.

La variación cuantitativa observada concuerda con la disminución en el número e intensidad de las bandas reflejadas en el electroforetograma y densitograma realizado a las diferentes fases analizadas. La cantidad de proteína es determinante de las propiedades físicas de la solución proteica, lo que se confirmó al asociar la viscosidad, como parámetro de medida de las propiedades físicas, con el contenido proteico encontrándose una asociación directa entre estas dos variables.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la U.C.V por permitirnos a través de su apoyo financiero llevar a cabo este estudio. Así mismo queremos expresar nuestro agradecimiento a la Beneficiadora de Ganado Caracas C.A.; al personal del Laboratorio de Biotecnología, Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia U.C.V. y finalmente al personal del Laboratorio de Parasitología, Medicina Tropical, Facultad de Medicina, U.C.V. por su incondicional asesoría.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Draus FJ, Leung SW. Characteristics and properties of bovine submaxillary mucoid. Arch Oral Biol. 1960; 3: 35-40
- Escalona L; Perrone, M; Soto-Luna, M y Acevedo AM. Preparación de una solución proteica de mucina para ser utilizada en pacientes con xerostomia (Venezuela). Acta Odont Venez. 27:55-59.
- Herrera M. Variación de la viscosidad de un sustituto salival UCV con el pH, concentración de proteína y tratamiento térmico. Trabajo de Ascenso .UCV.1994.pp135
- Herrera M, Acevedo AM, Escalona LA, Soto-Luna M, Lalaguna F. Variación de la viscosidad en un sustituto salival en base a mucina por cambios en el pH y la concentración de proteínas. Acta Odont. Venez .1996; 34(3):15-17.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227:680-685
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J Biol Chem .1951; 193: 265-75.
- S-Gravenmade EJ, Roukema PA, Panders AK. The effect of mucin-containing artificial saliva on severe xerostomia. Int J Oral Surg 1974; 3: 435-439
- Oemrawsingh I, Roukema P. Isolation, purification and chemical characterization of mucins from human submandibular gland. Archs Oral Biol .1974; 19:615-626.
- Verman M, Benz-Valentin xx; Amerogen NA. Viscosity of human salivary mucins: Effect of pH and ionic strength and role sialic acid. J Biol Buccale 1989; 17: 297-306.