

## DESNATURALIZACIÓN Y DEGRADACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE CALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL

Madaisy Cueto<sup>1</sup>, M<sup>a</sup> Jesús Dorta<sup>2</sup>, Obdulía Munguía<sup>2</sup>, Matías Llabrés<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de las Villas, 54830 Santa Clara, Villa Clara. Cuba.

<sup>2</sup> Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 382000 La Laguna. Tenerife. España.

### Introducción

El proceso de degradación de las proteínas tiene lugar en dos etapas, la primera reversible, corresponde al proceso de desplegamiento (desnaturalización) y la segunda irreversible, conduce a un estado final (degradación), que implica la pérdida total de actividad de la proteína. Este comportamiento viene descrito por el modelo de Lumry Eyring(1).



Donde N representa la proteína nativa, U el estado desplegado y F el estado final. La transición desde el estado nativo hasta el estado desnaturalizado ha sido estudiada en numerosas proteínas utilizando como agentes desnaturalizantes urea, clorhidrato de guanidina, incrementos de temperatura, cambios en el pH y en la fuerza iónica(2-4). Como agentes estabilizantes se utilizan polioles y azúcares (2,5), estando también descrito el uso de ciclodextrinas que actúan reduciendo la agregación de la proteína y su precipitación, pero favorecen su degradación térmica(6-7).

La calorimetría de barrido diferencial(DSC) es una de las técnicas que se utiliza con mayor frecuencia en el estudio de la estabilidad térmica de proteínas (5,7,8), ya que es una de las más potentes para determinar los parámetros termodinámicos del desplegamiento térmico de las proteínas(9).

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de algunos factores de la formulación: concentraciones de lisozima, hidroxipropil-β-

ciclodextrina(HPβCD) y sacarosa, así como el efecto del pH, sobre la estabilidad térmica de la lisozima mediante DSC.

### Materiales y Métodos

La lisozima fue suministrada por Sigma Chemical Co., HPβCD cedida por Janssen Pharmaceutical y la sacarosa suministrada por Avocado. Todos los reactivos utilizados tenían grado analítico.

Los termogramas obtenidos se generaron con un calorímetro de barrido diferencial de flujo de calor (Mettler Toledo<sup>®</sup> mod. 821 e), utilizando crisoles de media presión de 120 μl con 70 μl de muestra, en un intervalo de temperatura de 30-90°C, a velocidad de 1 °C/min en atmósfera inerte de nitrógeno con un flujo continuo de 100 ml/min. Después del primer calentamiento la muestra era enfriada rápidamente(-100°C/min) hasta 30°C y vuelta a evaluar después de su estabilización durante 5 minutos a dicha temperatura.

Los termogramas se evaluaron utilizando el programa Star<sup>®</sup>. Después de la corrección de la línea de base, calculamos para cada análisis las áreas del primer y segundo ciclo de calentamiento( J s K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>), el flujo de calor máximo, C<sub>pT<sub>m</sub></sub> (J K<sup>-1</sup> mol<sup>-1</sup>) y la temperatura al flujo de calor máximo, T<sub>m</sub> (K). Las áreas se transforman en entalpías calorimétricas ΔH<sub>cal</sub>, dividiendo por 60 s K<sup>-1</sup> ( inverso de la velocidad de calentamiento) y por 1000 para convertir J en kJ. Con el fin de normalizar C<sub>pT<sub>m</sub></sub> con respecto a la fracción de proteína nativa al comienzo del experimento, utilizamos la relación C<sub>pT<sub>m</sub></sub>/área (s<sup>-1</sup>) en vez de C<sub>pT<sub>m</sub></sub>.

El estudio se desarrolló siguiendo un diseño experimental de segundo orden central compuesto rotacional con cuatro factores: concentraciones de lisozima( $X_1$ ), HP $\beta$ CD ( $X_2$ ), sacarosa ( $X_3$ ), y pH( $X_4$ ) y cinco niveles de cada factor (10). Para la realización del análisis estadístico se utilizó el programa Mathematica 4.0.

Las concentraciones de lisozima y HP $\beta$ CD utilizadas fueron 3.25, 4.25, 5.25, 6.25 y 7.25 mM para los valores codificados -2, -1, 0, 1 y 2. Las concentraciones de sacarosa utilizadas para los mismos valores codificados fueron 2, 4, 6, 8 y 10% p/v, y los pH utilizados 3, 4, 5, 6 y 7. Para mantener la fuerza iónica constante,  $\mu = 0.51$ , se utilizó cloruro sódico.

**Resultados y Discusión**

La transición endotérmica observada en todos los experimentos se explica por la ruptura de los enlaces hidrógeno y la pérdida de las interacciones hidrofóbicas en las cuales el agua compete tanto con la cadena principal como con los grupos de las cadenas laterales de la molécula(7).

La tabla 1 recoge los valores entre los cuales oscilaron la entalpía calorimétrica  $\Delta H_{cal}$ ,  $T_m$ ,  $C_{pTm}/\text{área}$  y la relación de áreas entre el segundo y el primer calentamiento ( $R_{\Delta H_{cal}}$ ) para los experimentos realizados.

Tabla 1. Datos calorimétricos

$\Delta H_{cal}$	226,0 – 406, 7 kJ mol <sup>-1</sup>
$T_m$	347,6 – 350,6 K
$C_{pTm}/\text{área}$	$1,75 \times 10^{-3} - 3,19 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$
$R_{\Delta H_{cal}}$	0,0 – 0,87

La figura 1 muestra la influencia sobre cada respuesta,  $\Delta H_{cal}$  (1-a),  $T_m$  (1-b),  $C_{pTm}/\text{área}$  (1-c) y  $R_{\Delta H_{cal}}$  (1-d) de las tres variables que resultaron estadísticamente significativas: pH, concentraciones de sacarosa y lisozima, permaneciendo en cada caso las restantes variables en el nivel cero que se corresponde con el punto central del diseño experimental. En el eje de abscisa se recogen los valores correspondientes a las variables codificadas.

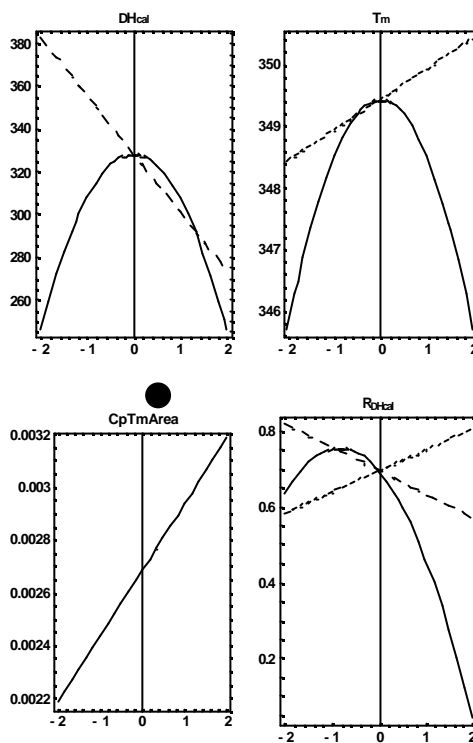


Figura 1. Dependencia de  $\Delta H_{cal}$  (Fig. 1-a),  $T_m$  (1-b),  $C_{pTm}/\text{área}$  (1-c) and  $R_{\Delta H_{cal}}$  (1-d) de la concentración de lisozima (- - -), concentración de sacarosa (- - -) y pH (3/4/4). Abscis variables codificadas.

El análisis de nuestros resultados pone de manifiesto que el pH desempeña un papel importante en las condiciones iniciales del ensayo así como en la etapa de degradación irreversible. La figura 1-a muestra la respuesta predicha de  $\Delta H_{cal}$  como función del pH, El valor máximo de  $\Delta H_{cal}$  se alcanza para  $X_4 = 0$ , equivalente a pH = 5, fijado  $X_1 = 0$ , condiciones en las cuales la fracción de proteína en estado nativo sería máxima. El máximo valor de  $T_m$  se alcanza también para  $X_4 = 0$ , pH = 5 (Figura 1-b,  $X_3 = 0$ ). Sin embargo, la relación  $C_{pTm}/\text{área}$  aumenta linealmente con el pH, este comportamiento parece deberse a la catálisis básica durante el proceso de desplegamiento. Este hecho no es sorprendente ya que la relación de entalpías calorimétricas (Figura 1-d) presenta un máximo para  $X_4 = -0,81$  equivalente a pH = 4,19. A la vista de estos resultados sería de esperar que la máxima estabilidad térmica se

alcanzase a  $\text{pH} = 5$ ; sin embargo a este  $\text{pH}$  la velocidad de desplegamiento es mayor que a  $\text{pH}$  inferiores, lo que se concluye de la dependencia de  $C_{pT_m}/\text{área}$  con el  $\text{pH}$ .

El análisis de la regresión muestra que la entalpía no se ve afectada significativamente por la concentración de sacarosa en el intervalo utilizado en nuestro experimento. Sin embargo la relación de áreas si aumenta, lo que evidencia el efecto estabilizante de la sacarosa. Asimismo la temperatura correspondiente al flujo de calor máximo también aumenta con la concentración de sacarosa.

La tercera variable que influye sobre la estabilidad de la lisozima es su concentración. Las figuras 1-a y 1-d muestran la influencia de la concentración de lisozima sobre la entalpía calorimétrica, y la relación de entalpías, con el resto de las variables codificadas fijadas a cero. La disminución de la entalpía de  $380 \text{ kJ mol}^{-1}$  a  $280 \text{ kJ mol}^{-1}$  es debida a la reducción de la fracción proteína en estado nativo en solución, este hecho no es sorprendente puesto que las proteínas tienden a agregarse a altas concentraciones. Además altas concentraciones de lisozima reducen su estabilidad térmica, pero no afectan a  $T_m$  ni a la relación  $C_{pT_m}/\text{área}$ . Este hecho sugiere que la agregación de la lisozima es responsable parcialmente de su inestabilidad térmica por medio de un mecanismo independiente del desplegamiento de la proteína. Estas consideraciones nos permiten concluir que el análisis por DSC nos conduce a identificar tres tipos de mecanismo implicados en la estabilización de la lisozima:

Primero, aquel que es el responsable de que el equilibrio entre los estados plegado y desplegado de la proteína este desplazado hacia el estado plegado. Esto se explica por un incremento en  $\Delta H_{\text{cal}}$ , por ejemplo fijando el  $\text{pH}$  en 5.

Segundo, aquel que reduce la velocidad de degradación irreversible. Este mecanismo puede producirse por un incremento en  $T_m$  y una reducción  $C_{pT_m}/\text{área}$ , por ejemplo a bajos  $\text{pH}$ .

Tercero, aquel que estabiliza la proteína plegada pero no desplaza el equilibrio hacia la fracción plegada ni reduce la degradación irreversible de la proteína desplegada. Este mecanismo, se identifica porque ni  $\Delta H_{\text{cal}}$  ni  $C_{pT_m}/\text{área}$  se ven

afectados pero se produce un incremento en  $T_m$ . La relación de áreas nos da una medida ponderada de los efectos de los diferentes factores implicados en la estabilización de proteínas.

### Agradecimientos

Este trabajo se financió gracias al proyecto de investigación 082/2000 de la Comunidad Autónoma de Canarias. Madaisy Cueto agradece a la AECl la beca concedida.

### Bibliografía

1. Lumry, R., Eyring, H., Conformation changes of proteins. *J. Phys. Chem.* 58, 110, (1954).
2. Gekko, K., Ito, H., Competing solvent effects of polyols and guanidine hydrochloride on protein stability. *Biochem. J.*, 107, 572, (1990).
3. Charman, S.A., Mason, K.L., Charman, W.N., Techniques for assessing the effects of pharmaceutical excipients on the aggregation of porcine growth hormone. *Pharm. Res.*, 10, 954, (1993)
4. Funahashi, J., Takamo K., Ogosahara, K., Yamagata, Y., Yutani, K., The structure, stability and folding process of amyloidogenic mutant human lysozyme. *J. Biochem.*, 120, 1216, (1996).
5. Kulmyrzaev, A., Bryant, C., McClements, D. J., Influence of sucrose on the thermal denaturation, gelation, and emulsion stabilization of whey proteins. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 1593, (2000).
6. Cooper, A., Effect of cyclodextrins on the thermal stability of globular proteins. *J. Am. Chem Soc.*, 114, 9208, (1992).
7. Branchu, S., Forbes, R. T., York, P. Nyqvist, H., A central composite design to investigate the thermal stabilization of lysozyme. *Pharm. Res.*, 16, 702, (1999).
8. Conejero-Lara, F., Mateo, P.L., Presence of a low dimerization equilibrium on the thermal unfolding of the 205-316 thermolysin fragment at neutral  $\text{pH}$ . *Biochemistry*, 35, 3477, (1996).
9. Remmele, R.L., Gombotz, W.R., Differential scanning calorimetry: A practical tool for elucidating the stability of liquid biopharmaceuticals. *Pharm. Tech. Eur.*, 12, 56, (2000).
10. Cochran, W.G., Cox, G.M., *Experimental Designs*, 2nd Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, (1957).