



EFECTO DEL POLIETILENGLICOL SOBRE LA FOTOESTABILIDAD DE LA C-FICOCIANINA Y SU SOLUBILIDAD A DIFERENTES pH

Emilio Polanco Isais, José González Valdez, Jorge Benavides,
Tecnológico de Monterrey, Centro de Biotecnología FEMSA, Monterrey CP 64859, correspondencia a
A00343058@itesm.mx.

Palabras clave: estabilización, c-ficocianina, polietilenglicol.

Introducción. La PEGilación es una técnica de estabilización de compuestos biológicos, la cual consiste en la unión covalente de una o más cadenas de polietilenglicol (PEG) a la superficie de la molécula objetivo, usualmente proteínas.⁽¹⁾ Si bien se ha caracterizado el efecto protector de la PEGilación contra agentes como proteasas, eliminación renal, etc. su capacidad de fotoprotección y de aumento de solubilidad en proteínas no-terapéuticas está poco estudiada.⁽²⁾ De igual manera, en base a sus características, la presencia PEG en solución puede ejercer un efecto protector contra factores como luz extrema.⁽³⁾

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de la PEGilación y del uso de PEG en solución sobre la fotoestabilidad y solubilidad a diferentes valores de pH, utilizando como modelo de estudio la proteína C-ficocianina (C-PC).

Metodología. Para la PEGilación de la C-PC se siguió un procedimiento previamente reportado para otra proteína⁽⁴⁾, obteniendo formas mono- y di-PEGiladas, las cuales fueron posteriormente recuperadas por cromatografía de exclusión de tamaño. Estos conjugados, así como la proteína pura (C-PC) y proteína con PEG en solución (6:1 mol PEG:C-PC) fueron sometidos a pruebas de desnaturalización por luz, y solubilidad en varios pH. Se depositaron 0.5 mg de proteína de cada muestra en un total de 300 μ L (volumen total aforado con agua Milli-Q pH 5.5), en un microplato de 96 pozos (100 μ L por pozo). El plato se dejó expuesto a luz directa con una intensidad de 2960 lux por 112 horas y una temperatura de 25 °C, tomando mediciones de absorbancia a 620 nm (Abs_{620}) en un lector de microplatos (BioTek Epoch).

El ensayo de solubilidad se realizó diluyendo 0.4 mg de proteína de cada muestra en un total de 300 μ L de soluciones ajustadas a pH 2, 3, 4, 5 y 6 con HCl y/o NaOH. Se depositaron 100 μ L por pozo y el plato dejó en incubación sin luz por 3 horas, midiendo su Abs_{620} cada 15 minutos. La precipitación se comprobó visualmente y por el aumento de la lectura dada por la presencia de turbidez.

Resultados. La Fig. 1 representa la cinética de degradación de la C-PC tras su exposición a la luz. Se encontró que en las proteínas no PEGiladas hubo un nivel de degradación mucho menor al de las PEGiladas, mientras que el uso de PEG en solución mostró un efecto protector con respecto a la proteína pura. El efecto

negativo de la PEGilación sobre la actividad es posiblemente debida a la reacción particular utilizada en la conjugación. En los ensayos de solubilidad se observó un aumento en la Abs_{620} de la C-PC y C-PC+PEG en el rango de pH 3-5, correspondiente a la precipitación de la proteína, la cual se confirmó de forma visual. Esto no se observó en la C-PC PEGilada, lo cual indica que la unión covalente de las moléculas de PEG a la proteína genera un aumento de solubilidad dentro del rango de pH estudiado, particularmente entre pH 3 y 5.

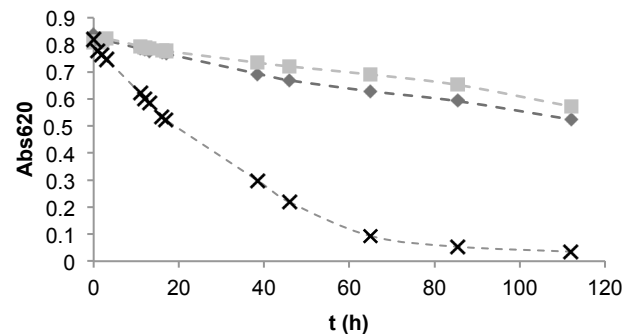


Fig. 1. Efecto de la PEGilación y el uso de PEG en solución sobre la fotoestabilidad de C-PC. C-PC (◆), C-PC con PEG en solución (■), y C-PC PEGilada (X).

Conclusiones. El uso de PEG en solución tiene un efecto fotoprotector sobre la C-PC. Existe un efecto positivo de la PEGilación sobre la solubilidad de C-PC a diferentes valores de pH, más no sobre su fotoestabilización. Es necesario optimizar las condiciones de reacción para establecer el potencial de las estrategias descritas sobre la estabilidad y solubilidad de C-PC y otras proteínas similares.

Agradecimiento. Agradecemos el apoyo financiero por parte de CONACyT (Apoyo 305577), del Grupo de Enfoque en Bioprocesos y Biología Sintética (Cuenta 0821C01004) del Tecnológico de Monterrey, y del Proyecto Tec de Monterrey-ZH (Cuenta 0020CDB087).

Bibliografía.

1. Pasut, G., Veronese, F. M. (2012). *J Control Release*, 161(2): 461-72.
2. González-Valdez, J., Rito-Palomares, M., Benavides, J. (2012). *Anal Bioanal Chem.*, 403 (8): 2225-35.
3. Payne, R.W., Murphy, B. M., Manning, M. C. (2011). *Pharm Devel Technol.*, 16 (5): 423-40.
4. Daly, S. M., Przybycien, T. M., Tilton, R. D. (2005). *Biotechnol Bioeng.*, 90 (7): 856-68.