

Avaliação do sítio de ligação de tetraciclinas na albumina do soro humano por fluorescência molecular e a influência do ácido mirístico

Thamilla Maria Silva Maciel (IC), Josué Carinhanha Caldas Santos (PQ)*
 thamillamaciel@hotmail.com

Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Campus A.C. Simões, Maceió, AL, Brasil.

Palavras Chave: tetraciclinas; albumina do soro humano; sítio de ligação; ácido mirístico; fluorescência molecular.

Introdução

A albumina do soro humano (HSA) é a proteína mais abundante no plasma e tem como principal função o transporte de várias substâncias endógenas (ácidos graxos e íons metálicos) e exógenas (como fármacos). A HSA possui três domínios de ligação, os quais se dividem em subdomínios, sendo os principais sítios de ligação localizados nos subdomínios IIA (sítio 1) e IIIA (sítio 2). De acordo com a literatura, alguns estudos sobre a interação de tetraciclinas com a HSA foram relatados, contudo ainda existem divergências quanto ao sítio preferencial de ligação deste fármaco.^{1,2,3} Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o sítio de ligação da HSA com diferentes tetraciclinas por ensaios de competição empregando varfarina (VAR, marcador do sítio 1) e ibuprofeno (IBU, marcador do sítio 2), utilizando a técnica de espectrometria de fluorescência molecular, com e sem a influência do ácido mirístico (AM). O AM é um ácido graxo endógeno, sabendo que os ácidos graxos são distribuídos ao longo da proteína, envolvendo todos os seus subdomínios, podem assim interferir na afinidade da HSA pelas diferentes tetraciclinas.

Resultados e Discussão

Neste estudo foram empregadas a tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clorotetraciclina (CTC) para avaliação com HSA. Os ensaios foram realizados em pH = 7,4 (tampão tris, 50 mM) com NaCl 100 mM para ajuste de força iônica. Para avaliação da interação explorou-se a fluorescência intrínseca da proteína com $\lambda_{exc} = 280$ nm e $\lambda_{em} = 339$ nm na ausência e presença dos ligantes (TC, OTC ou CTC). As titulações espectrofluorimétricas foram realizadas empregando-se 1 μ M de HSA e dos respectivos marcadores. O ácido mirístico (AM) foi avaliado nas concentrações de 0,5 e 1 μ M e empregaram-se concentrações das tetraciclinas na faixa de 1 a 30 μ M. Neste estudo se determinou a constante de ligação (K_A) e a estequiometria do complexo proteína-ligante (n). Na avaliação da interação das diferentes tetraciclinas com HSA notou-se diminuição na fluorescência intrínseca da proteína à medida que os excessos das tetraciclinas foram adicionados, o que confirma o mecanismo de interação por transferência de energia (*quenching*) da HSA para as tetraciclinas. Os valores das constantes de ligação das diferentes tetraciclinas com a HSA são listados na Tabela 1. De acordo com os resultados, a interação entre as tetraciclinas e a

HSA sofre uma maior influência na presença da varfarina do que na presença do ibuprofeno, pois as constantes diminuíram significativamente (de 32 a 90%) na presença da VAR, indicando interação preferencial destas moléculas TC, CTC e OTC pelo sítio 1 da HSA. Os compostos que se ligam preferencialmente ao sítio 1 são aromáticos planares, ácidos dicarboxílicos e moléculas heterocíclicas com carga negativa localizada, como as moléculas avaliadas no pH fisiológico.

Tabela 1. Valores de K_A (10^5 L M⁻¹) e n na ausência do AM.

Sistema	Sem marcador		Marcadores			
	K_A	n	VAR		IBU	
			K_A	n	K_A	n
TC	5,62	1,18	0,59	1,04	11,2	1,30
CTC	1,20	1,08	0,12	0,90	1,00	1,08
OTC	2,63	1,15	1,78	1,10	10,0	1,28

Na presença do AM (independente da concentração) foi observado uma diminuição no valor de K_A para a tetraciclina (Tab. 2) quando comparado com a constante de ligação da HSA com a tetraciclina na ausência do ácido graxo (Tab. 1). Este fato deve estar associado e a competição de sítios de interação da tetraciclina com o AM na HSA.

Tabela 2. K_A (10^5 L M⁻¹) e n na presença do AM para tetraciclina.

AM (μ M)	Sem marcador		Marcadores			
	K_A	n	VAR		IBU	
			K_A	n	K_A	n
1,0	2,47	1,35	2,17	1,34	2,08	1,34
0,5	3,87	1,18	1,65	1,10	3,04	1,17

Na proporção HSA:AM (1 μ M) de 1:1 observou-se que os valores de K_A foram similares na presença e ausência dos marcadores (Tab. 2). Quando a concentração do AM diminuiu a constante reduziu na presença de VAR, como esperado. Isto ocorreu devido ao aumento da afinidade da HSA pela VAR provocada pelo AM, como afirma Isabelle Petitpas e col. (2001)⁴, e devido a isto a TC interagem com outros sítios da HSA.

Conclusões

Os resultados indicam que a TC, CTC e OTC se ligam preferencialmente ao sítio I (subdomínio IIA) da HSA, podendo sofrer deslocamento na presença do AM a depender da concentração do mesmo.

Agradecimentos

IQB- UFAL, CAPES, CNPq

¹ Chi, Z. e Liu, R. *Biomacromolecules*, 2011. ² Bi, S.; Song, D.; Tion, Y.; Zhou, X.; Liu, Z. e Zhang, H. S. A. *Mol Biomol Spectrosc*, 2005. ³ Khan, M.A.; Muzammil. S. e Musarrat. J. *Int J Biol Macromol*. 2002. ⁴ Petitpas, I.; Bhattacharya, A. A.; Twine, S.; East, M. e Curry, S. *J. Biol. Chem.* 2001.