

Binding site evaluation and the of glucose and calcium ions influence in the interaction process between tetracycline and carrier proteins.

Thamilla Maria Silva Maciel (IC), Josué Carinhanha Caldas Santos (PQ)*

E-mail: thamillamaciel@hotmail.com

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

Palavras Chave: sítio de ligação, tetraciclina, proteínas carreadoras, íons cálcio, glicose, fluorescência molecular.

Abstract

The binding site of tetracyclines in the HSA and BSA was evaluated and influence of glucose and Ca(II) in the interaction process.

Introdução

As tetraciclina (TCs) são amplamente usadas na medicina humana, pois são antibióticos de largo espectro bacteriano. Alguns estudos sobre a interação de tetraciclina com a albumina do soro humano e bovino (HSA e BSA) foram relatados, contudo ainda existem divergências quanto ao sítio preferencial de ligação. Adicionalmente, o sítio preferencial de ligação e intensidade da ligação pode ser afetado pela presença de compostos endógenos, como os íons de cálcio e a glicose. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o sítio de ligação preferencial para a tetraciclina frente à HSA e BSA e avaliar a influência de glicose (Gli) e íons Ca(II) nos parâmetros de interação.

Resultados e Discussão

Neste estudo foram empregadas a tetraciclina (TC), oxitetraciclina (OTC) e clortetraciclina (CTC) para avaliação com HSA e BSA. 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 ($\lambda_{exc} = 280$ 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, BSA e dos respectivos marcadores. A Tabela 1 apresenta os valores das constantes de ligação (K_A) na ausência e presença dos competidores varfarina (sítio I) e ibuprofeno (sítio II) como marcadores. Com base nos resultados as diferentes tetraciclina se ligam preferencialmente ao sítio I, o qual interage preferencialmente com compostos (poli)aromáticos.

Tabela 1. K_A (10^5 L mol⁻¹) da interação entre TCs com HSA e BSA.

Proteína	Sistema	Sem marcador		Marcadores			
		K_A	n	VAR		IBU	
HSA	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
BSA	TC	4,06	1,21	1,02	1,08	3,98	1,09
	CTC	82,3	1,46	14,8	1,30	97,2	1,49
	OTC	1,60	1,31	0,74	1,26	1,18	1,29

Adicionalmente, os ensaios também foram realizados empregando digoxina como marcador, a qual não se liga ao sítio I ou II. Os valores de K_A não tiveram

diferença significativa em relação à condição de referência para ambas às proteínas avaliadas. Os ensaios para avaliação da influência de glicose e Ca(II) foram realizados apenas para tetraciclina e HSA, simulando as condições fisiológicas destas espécies. De forma geral, foi observada uma diminuição no valor de K_A para a TC (Tabela 2) quando comparado com a constante de ligação da HSA com a TC na ausência do Ca(II) e glicose (Tabela 1). Porém, o sítio preferencial de ligação não foi alterado. Para o Ca(II) estes resultados podem estar associados à: i) competição do mesmo sítio de interação da HSA (sítio I) entre TC e Ca(II) ou, ii) formação de complexo TC-Ca(II) levando a redução da afinidade da TC livre pela proteína. Para glicose ocorre ligação covalente entre este açúcar e o resíduo de lisina 195 localizado no sítio I da HSA, levando ao bloqueio parcial do sítio, e redução de K_A em relação à interação HSA-TC.

Tabela 2. Influência de íons Ca(II) e glicose nos valores de K_A (10^5 L mol⁻¹) para interação da TC com a HSA.

Sistema	Sem marcador		Marcadores			
	K_A	n	VAR		IBU	
TC+Ca(II)	0,73	1,04	0,12	0,88	0,86	1,07
TC+Gli	2,35	1,18	1,29	1,10	2,23	1,13
TC+Ca(II)+Gli	1,87	1,14	0,32	1,01	2,07	1,15

Empregando fluorescência sincronizada foi observado exposição preferencial do resíduo de triptofano ($\Delta\lambda = 60$ nm) para um microambiente de maior polaridade em relação a tirosina ($\Delta\lambda = 15$ nm). Pôde-se verificar que a condição contendo Ca(II) levou a uma maior exposição, seguido da presença de glicose em relação a ausência destas espécies no meio. O índice de hidrofobicidade empregando ANS como sonda foi calculado. A presença de TC conduziu a redução sistemática da hidrofobicidade na superfície da HSA. Na presença de Ca(II) houve uma redução de 28%, enquanto que a glicose levou ao aumento da hidrofobicidade na superfície da proteína em 25%.

Conclusões

As TCs se ligam ao sítio I da HSA e BSA e a presença de Ca(II) e glicose não altera o sítio de ligação, contudo mudam a intensidade da interação e aspectos estruturas da proteína.

Agradecimentos

IQB-UFAL, CAPES, CNPq.