

DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE FIJACIÓN DEL Cr^{+3} A LA ALBÚMINA SÉRICA BOVINA

^{1,2}Bertoluzzo SMR, ¹Bertoluzzo MG, ¹Quattrin FE, ¹Rigatuso RO, ²Godoy N, ³Corchs JL

¹ Taller de Física: Una alternativa Pedagógica – Área Física-Fac. de Cs. Bioq. y Farm.-UNR

² Cátedra de Biofísica-Fac. Cs. Médicas –UNR

³ Cátedra de Fisiología- Fac.Cs.Médicas -UNR
Suipacha 531-(2000) Rosario

mgbysmb@cablenet.com.ar

La contaminación por cromo es un tema preocupante por las consecuencias sanitarias de toxicidad de este elemento y su condición de carcinogénico. Tales propiedades son consecuencia de su afinidad hacia macromoléculas biológicas. En el presente trabajo se estudia la afinidad a la albúmina sérica, principal carrier de la sangre. Se trabajó con albúmina sérica bovina (ASB) y una sal de cromo y potasio. Por medio de espectrometría de fluorescencia, se midió la fijación del ANS (anilino-8-naftalen sulfónico) a la albúmina por emisión de fluorescencia cuando el ANS se une a la proteína en presencia y en ausencia de Cr^{+3} . De los resultados obtenidos se evidencia cierta competencia del Cr^{+3} por los sitios de fijación del ANS a la albúmina.

In the present work Cr^{+3} affinity to the serum albumin is studied. Bovine serum albumin (BSA) and anilino-8-naphtalene sulfonate (ANS) were used. The ANS binding to the BSA was followed by fluorescence emission when the ANS bound to the protein in presence and in absence of Cr^{+3} . From the results obtained it could be concluded that there is a competition between Cr^{+3} and the ANS for the binding sites to the albumin.

INTRODUCCIÓN

Metales pesados, como el cinc (Zn), cobre (Cu) y cromo (Cr), ocupan un lugar frecuente e importante en la literatura toxicológica. El gran número de hechos toxicológicos más o menos importantes es la razón por la cual los metales pesados son considerados como elementos tóxicos. Pero por otro lado en la literatura no toxicológica son descriptas las acciones favorables de los metales pesados por lo cual se podría considerar a los metales pesados como elementos esenciales. El concepto esencial o tóxico es relativo y depende de un número de factores y datos (dosis, tiempo, forma química, individualidad del organismo, interacción con otras sustancias en el medio ambiente, etc.) Esta vista relativa tiene validez para elementos traza en general y es muy importante en particular con respecto a la prevención de daño de salud causado por deficiencia o exceso de una sustancia. Aunque algunos aspectos del metabolismo de los metales pesados como por ejemplo su transporte no se entienden completamente, muchas líneas de evidencia indican que ciertas proteínas especializadas juegan un rol muy importante en el control de la homeostasis de elementos traza. En

nuestro caso nos interesa analizar los problemas concernientes a la presencia de cromo en el sistema biológico, debido a que en nuestra zona hay casos de contaminación de agua por cromo, causando problemas sanitarios. Esto se debe especialmente a la presencia de industrias papeleras y curtiembres. Estas industrias generan miles de toneladas de desechos sólidos, potencialmente tóxicos debido precisamente a su alto contenido de cromo. Al respecto la Agencia de Protección Ambiental de EEUU (EPA), advirtió que el "... el cromo, arsénico, mercurio y los sulfuros que utilizan las curtiembres y que éstas no saben eliminar o que son lanzados a la superficie, causan severos daños como por ejemplo, leucemia. Pero además son carcinogénico de pulmón, cavidad nasal y seno paranasal...". Está comprobado también que provoca irritación gastrointestinal, úlcera estomacal, daños renales hepáticos, enfermedades de la piel y afecciones respiratorias agudas. Cuando las dosis de cromo son bajas, éste se deposita en la piel, pulmones, músculos y grasas. Pero cuando las dosis son muy altas, (o también bajas pero con exposiciones durante largo tiempo), pasa a acumularse en el hígado, bazo, espina dorsal, cabello, uñas, y placenta. Esto nos indica que entonces altas

dosis de cromo pueden provocar mucho daño por contaminación de la sangre. Tales propiedades son consecuencia de su afinidad hacia macromoléculas biológicas⁽¹⁾. El cromo fue descubierto por el químico francés Louis Nicola Vangelis en el año 1797. Si bien este elemento tiene un rango de valencia que va desde (-2) a (+6), en el medio ambiente, el cromo existe en estado trivalente o hexavalente.

El objetivo de nuestro trabajo, por lo anteriormente expuesto, es estudiar la afinidad del Cr^{+3} al principal carrier (transportador) de la sangre, la albúmina, o sea a la albúmina sérica.

MATERIALES Y MÉTODO:

Dado que las propiedades fisicoquímicas de la albúmina sérica humana, (ASH) son prácticamente las mismas que las de la albúmina sérica bovina, (ASB), se trabajó con esta última (ASB) con una concentración de 20 μ M y en buffer fosfato, pH= 7,4 (pH fisiológico) para preservar las condiciones de bioseguridad. Como fluoróforo⁽²⁾ se utilizó ANS (anilino-8-naftalen sulfónico) y como fuente de cromo se utilizó alumbre de cromo, 5 mM ($CrK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) de grado analítico.

La fijación de ANS a la ASB fue seguida mediante la medición del incremento de emisión de fluorescencia cuando el ANS se une a la proteína^(3,4). Se tituló ASB (20 μ M, pH 7,4) con ANS (1 mM) en ausencia y en presencia de Cr^{3+} . De las isotermas de fijación se determinaron las constantes de afinidad, y el número de sitios de fijación, así como también las características de la interacción. Las medidas de fluorescencia se realizaron con un espectrofluorómetro Jasco FP 770, con una cubeta termostatizada de 10 mm de espesor. Se trabajó con una longitud de onda de excitación, λ_{ex} de 370 nm y longitud de onda de emisión, λ_{em} de 470 nm. Se obtuvieron así las isotermas de fijación,

las que nos permitieron determinar los parámetros de fijación del cromo a la albúmina; o sea, determinar el número de sitios de fijación y la constante de afinidad. Para ello se utilizaron los gráficos de Scatchard, y para descartar cooperatividad, se analizaron los gráficos de Hill correspondientes. Para averiguar si hay competencia por el sitio entre el cromo y el ANS, se midió la variación de fluorescencia en función de la concentración de cromo, cuando la solución de ASB se hallaba saturada de ANS

RESULTADOS

La gráfica 1 representa el incremento de emisión de fluorescencia (ΔF) cuando el ANS se une a la ASB que contiene Cr^{+3} .

El número de moléculas de ligando fijado está relacionado con la constante de equilibrio, el número de sitios de fijación de la macromolécula y con las concentraciones de macromolécula y de ligando. Por ello usualmente para estudiar los sitios de fijación de una macromolécula se utiliza la técnica de Scatchard⁽⁴⁾. La ecuación de Scatchard establece:

$$\frac{r}{C} = K N - K r$$

Donde :

r : número promedio de ligando fijado a la macromolécula

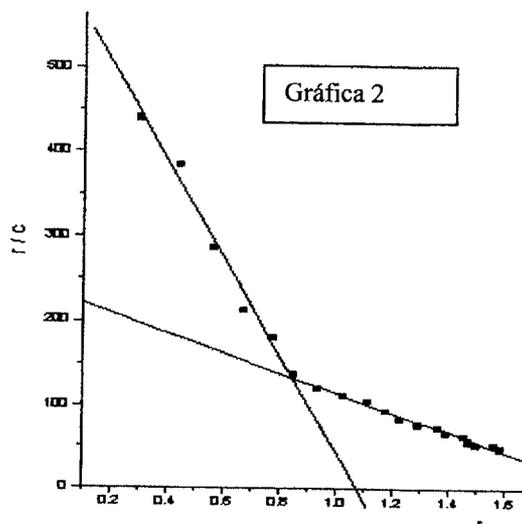
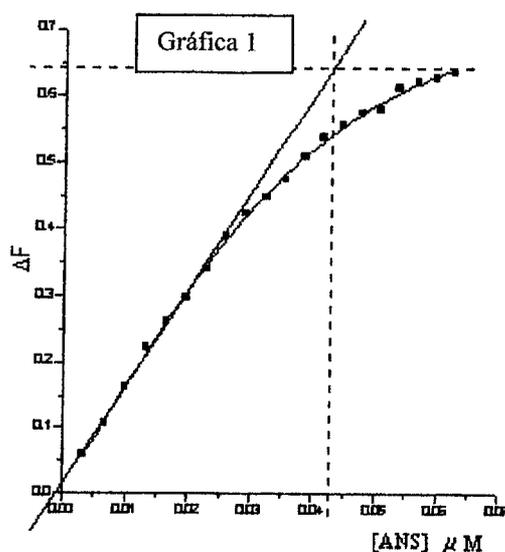
C : concentración de ligando libre

K : constante de equilibrio para la unión a un determinado sitio

N : Número de sitios totales por macromolécula

De manera que la gráfica de r/C en función de r nos permite determinar las constantes de fijación y el número de sitios. (Ver gráfica 2).

De estas isotermas de fijación, podemos obtener dos



parámetros, el número de sitios de fijación y las constantes de fijación.

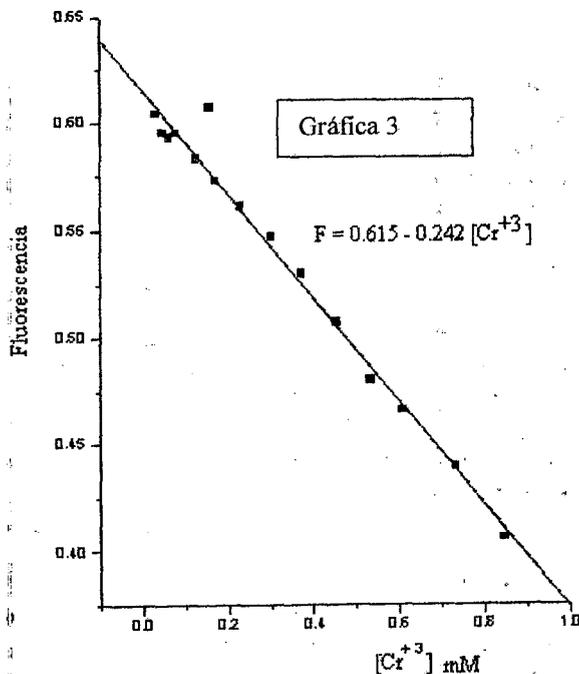
En la tabla se resumen los resultados obtenidos.

[Cr ⁺³] μM	Número de sitios totales (N)	Cte. de alta afinidad (K ₁) M ⁻¹ x 10 ⁵	Cte. de baja afinidad (K ₂) M ⁻¹ x 10 ⁴
16	1,75	(1,39±0,04)	
32	2,08	(2,0±0,5)	(7,1±0,2)
48	1,87	(1,6±0,2)	(7,3±0,8)
64	1,38	(1,6±0,5)	(7,1±0,3)

Los resultados obtenidos evidenciaron dos sitios de fijación, y como la distribución espacial de los sitios no tiene efecto en la ecuación de Scatchard, para determinar si son sitios independientes entre sí, se graficó el log(r/N-r) en función de log [Cr⁺³], conocido como gráfico de Hill, cuya pendiente resultó cercana a uno, indicando entonces que los sitios son efectivamente independientes.

Finalmente, para comprobar que efectivamente, el Cr compite por los sitios del ANS, en la ASB, se saturó la ASB, con ANS, y luego se tituló con Cr⁺³. Los resultados obtenidos se informan en la gráfica 3.

CONCLUSIONES



De los resultados obtenidos podemos concluir que existe un sitio de fijación de alta afinidad del cromo a la albúmina y otro de baja afinidad^(5,6). La

constante de alta afinidad resulta ser de $(1,6 \pm 0,3) 10^5 M^{-1}$ y la constante de baja afinidad de $(7,1 \pm 0,3) 10^4 M^{-1}$. Como el gráfico de Hill resultó ser lineal, y de pendiente (1.16 ± 0.01) , se evidencia que no hay cooperatividad entre los sitios, es decir, los sitios son independientes entre sí.

Al saturar la albúmina con ANS hasta una concentración final de ANS de $62 \mu M$, agregándole alícuotas de cromo se observa una extinción de la fluorescencia en forma lineal hasta una relación de 8 moles de cromo por cada mol de albúmina. Podríamos decir entonces que el cromo desplazaría al ANS de su sitio de fijación; a partir de que el comportamiento deja de ser lineal se supondría que la concentración de cromo es tan alta que produciría la agregación de la albúmina.

REFERENCIAS

1. Thermodynamic Theory of site- Specific Binding Processes in biological macromolecules. Enrico Cera- Cambridge University Press- 1995.
2. Influence of the medium conditions on the 1-anilino-8-naphtalene sulfonate-bovine serum albumin binding. B. Nerli and G. Picó- Archives Internacionales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique-1994, 102, 5-8
3. Spectroscopy and Spectrofluorimetry. Harry, Y & Brashford, C.L- 1987
4. Physical Chemistry. Principles and Application in biological sciences. I. Tinoco-K. Saber- J. Wang- Prentice Hall.
5. Determination of Cr⁺³ Binding Parameters to the Bovine Serum Albumin. SM Bertoluzzo, et al. Biocell, vol25- N°2-2001.
6. Incidencia de la presencia de iones potasio, en la fijación de Cr⁺³ a la albúmina sérica humana. SM Bertoluzzo, et al. XXI Reunión anual Sociedad de Biología Rosario. Noviembre 2001.