

# ESTUDO COMPARATIVO DA REATIVIDADE DE HEMINA E SEUS DERIVADOS CONJUGADA COM ALBUMINA: MODELOS DE COMPLEXOS GERADORES DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

Greice Tatiana Castilho <sup>1</sup>; Tatiana Prieto <sup>2</sup>; Ivarne dos Santos Tersariol <sup>3</sup>

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: greicecastilho@bol.com.br <sup>1</sup>

Pesquisadora colaboradora da Universidade Federal de São Carlos; e-mail: tati\_prieto@yahoo.com.br <sup>2</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: ivarne@umc.br <sup>3</sup>

**Área do Conhecimento:** Bioquímica

**Palavras-chave:** Hemina; Albumina (BSA); Radicais Livres (EROS).

## INTRODUÇÃO

A hemina é um composto orgânico denominado porfirina. As porfirinas possuem como base estrutural um macrociclo tetrapirrólico, que contém um metal no centro ativo ( $Fe^{3+}$ ). A hemina é uma molécula hidrofóbica que tem a capacidade de contribuir com o estresse oxidativo e é solúvel em meio alcalino. Porfirinas e compostos relacionados têm sido amplamente utilizados como drogas terapêuticas. A maioria das aplicações clínicas concentra-se em detecção de fluorescência e fotodinâmica na terapia do câncer (Silva *et al.*, 2004).

A albumina sérica humana é a proteína mais abundante do plasma humano. Devido a sua importância fisiológica e à relativa facilidade com que pode ser isolada e purificada, muitos estudos referentes à sua ligação a diversos compostos têm sido conduzidos. Tais estudos foram ainda mais estimulados com a determinação da estrutura primária da albumina humana (HSA) e bovina (BSA), de modo que a sequência de aminoácidos das duas proteínas difere em alguns aspectos (Meloun *et al.*, 1975). Brown comparou a albumina humana e bovina, revelando cerca de 80% de identidade (Brown, 1976).

A capacidade celular de endocitar albumina somado ao fato desta possuir um sítio específico de ligação para hemina, torna esta proteína um ótimo modelo de estudo para veículo de entrega de protoporfirinas às células.

## OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho é estudar e comparar a reatividade de compostos derivados albumina/heminas metais substituídas, compostos altamente pró-oxidantes. Foi analisada a relação da estrutura e reatividade dos complexos BSA-hemina livre, BSA-hemina cobre II substituída e BSA-hemina zinco substituída assim como a resposta das linhagens celulares K562 (leucêmica) e células da musculatura lisa CHO K1 aos efeitos deletérios do peróxido de hidrogênio na presença do complexo BSA-hemina cobre II substituída e BSA-hemina zinco substituída.

## METODOLOGIA

A retirada do ferro hemínico foi realizado utilizando o ácido fluorídrico na proporção de 6 ml do ácido para cada 100 mg de proteína, a reação teve duração média de 10 minutos (sob agitação e resfriamento), (Vanderkooi, 1975). Para eliminação de resíduos do processo, foram realizados repetidos processos de centrifugação com eliminação do sobrenadante.

Para a complexação da hemina ferro livre a albumina foi preparada uma solução de hemina ferro livre dissolvida em solvente N-N Dimetilformamida (DMF) e

paralelamente foi preparada uma solução aquosa de BSA. A quantificação das concentrações das soluções aquosas de BSA e da hemina ferro livre foram feitas no espectrofotômetro UV vis, utilizando coeficiente de extinção molar  $\epsilon_{279\text{nm}} = 4,43 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Peters, 1996) para BSA e  $\epsilon_{385\text{nm}} = 5,84 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Yang *et al.*, 2010) para a hemina ferro livre. As soluções de hemina ferro livre e a BSA<sub>aq</sub> foram misturadas, de maneira que a relação molar entre a hemina e a BSA fosse de 1:1.

Para a síntese da hemina cobre II substituída foi adicionado uma solução de hemina ferro livre em solvente Tetrahidrofurano (THF) em uma relação 1:1 (v/v) e adicionado o sal acetato de cobre II em uma proporção de 6 vezes em relação a hemina ferro livre. Terminada a reação o solvente THF foi evaporado através de uma fonte de calor direta e a hemina foi ressuspensa em solvente N-N Dimetilformamida (DMF).

A determinação da incorporação e da concentração da solução foi realizada através de leitura em espectroscopia de UV- Vis. A complexação da BSA a hemina cobre II substituída foi realizada utilizando uma relação molar entre hemina e BSA de 1:1.

Para a síntese da hemina zinco substituída foi adicionado uma solução de hemina ferro livre em uma solução de fosfato de sódio 10 mM com valor de pH 2.0 acertado com ácido acético glacial p.a., com uma relação 1:1 (v/v) e foi acrescentado um excesso de 10 vezes do sal acetato de zinco em relação a hemina ferro livre. A reação de incorporação ocorreu após 12 horas de agitação em 150 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz.

A incorporação do complexo hemina zinco substituída à albumina foi realizada utilizando uma relação molar entre a hemina e a BSA de 1:1. A reação ocorreu após 12 horas de incubação sobre agitação de 150 rpm, temperatura ambiente e protegida da luz. Após a incorporação da BSA o excesso de sal acetato de zinco foi removido por diálise contra água deionizada, no escuro, a temperatura ambiente e por 37 horas. Em seguida a amostra foi concentrada utilizando um concentrador com limite de exclusão de 3000 MW, Millipore®, centrifugado por 1 hora, 6000 rpm a 4°C.

A determinação da incorporação de todos os complexos foi realizada através de leitura em espectroscopia de UV- Vis. da Shimadzu MultiSpec 1501.

Para os experimentos utilizando as células K562, foram feitos os cultivos em meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co.) suplementada com 10% de SFB, 100 unidades/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina, 5% de CO<sub>2</sub> e temperatura 37 °C (Sanyo MCO-20AIC, Japan). Para realização dos experimentos,  $3 \times 10^4$  células/ml foram plaqueadas e incubadas com os seguintes reagentes por um período de 12 horas nas mesmas condições de cultivo celular: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2 mM, BSA-hemina cobre II substituída 2 µM. Decorrido o período de incubação as células foram centrifugadas por 3 minutos, a 1500 rpm e o *pellet* ressuspensa em 100 µL de azul de Trypan 0,4%. A viabilidade celular foi então calculada, utilizando uma câmara de Neubauer. Os resultados correspondem a uma média de três experimentos.

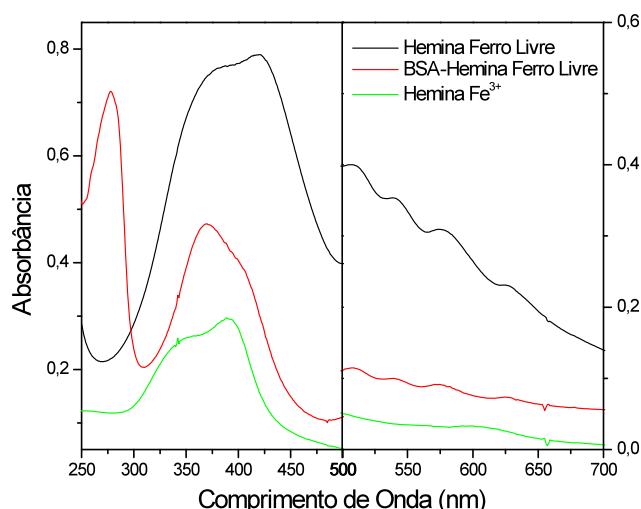
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O espectro a seguir demonstra: (i) eficácia da remoção do ferro hemínico e (ii) acoplamento da hemina sem ferro a BSA. Os espectros hemina nativa (linha verde) comparado ao espectro hemina sem ferro (linha preta) mostram um deslocamento do  $\lambda_{\text{max}}$  da banda Soret, banda correspondente a absorção do anel porfirínico, de 392 nm para 421 nm, respectivamente, assim como substituição da banda de transferência de carga em 615 nm (linha verde) pelas quatro bandas 508, 542, 574 e 623 nm correspondentes a protoporfirina desmetalada (linha preta), (Vanderkooi *et al.*, 1973).

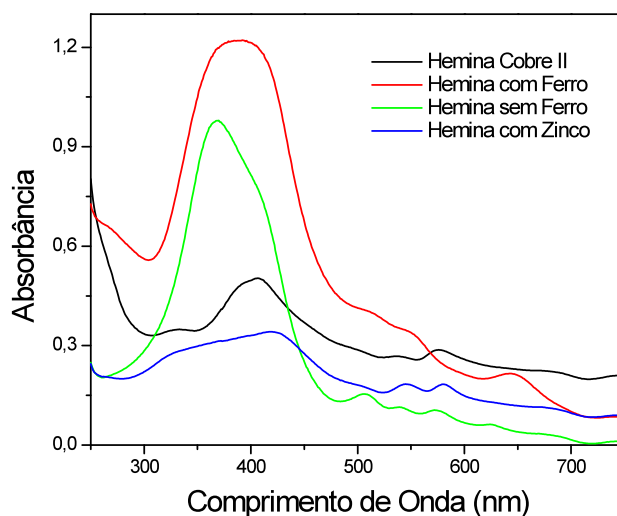
Na complexação da BSA a hemina ferro livre, nota-se o aparecimento de um pico de absorvância em 279 nm, característico do espectro de absorvância da albumina, além do

desvio hipsocrômico (*blue-shift*) da banda Soret de 375 nm para 367 nm, permanecendo com as quatro bandas Q, características de protoporfirina sem ferro.

Cabe mencionar que a solubilidade da hemina é desfavorável em meio aquoso, tendendo a formação de dímeros em valores de pH neutro e ácido. No espectro apresentado, podemos notar o desdobramento da banda Soret em dois picos, sugerindo duas espécies de hemina, monomérica e dimérica. O acomplamento da hemina sem ferro a BSA, aparentemente favoreceu a espécie monomérica, evidenciado pela inversão das proporções da banda Soret.



**Figura 1.** Espectro eletrônico UV- Vis da hemina ferro livre, da complexação BSA-hemina ferro livre e da hemina Fe<sup>3+</sup>. As amostras foram analisadas em solução aquosa, sob temperatura ambiente.



**Figura 2.** Espectro eletrônico de absorção UV-Vis da hemina ferro livre (linha verde), hemina nativa (linha vermelha), hemina cobre II substituída (linha preta) e hemina zinco substituída (linha azul). As amostras foram analisadas em solução aquosa, em temperatura ambiente.

O espectro da figura 2 demonstra a eficácia do acoplamento da hemina sem ferro aos metais cobre II e zinco. Além das modificações já discutidas no espectro 1 da hemina sem ferro (linha verde) e da hemina nativa (linha vermelha), é possível observar que quando ocorre o acoplamento do metal no centro ativo da hemina devido ao desaparecimento de duas bandas Q (508 nm e 623 nm) características da protoporfirina sem ferro e ao deslocamento da banda *Soret* para comprimento de onda maior (368 nm para 406 nm para o cobre e 420 nm para o zinco), quando comparada a hemina sem ferro (linha verde). Cabe resaltar que em ambos os acoplamentos é possível notar a

permanência das duas bandas Q, 536 nm e 574 nm, indicando a presença dos metais cobre e zinco.

## CONCLUSÕES

Foi possível observar que ocorreu a desmetalização da hemina e a incorporação dos metais substitutos cobre II e zinco no seu centro ativo. A complexação da hemina com a BSA também foi satisfatória e confirmada por espectrofotometria UV vis.

Os testes iniciais com células K562 mostraram que o complexo BSA-hemina cobre II substituída tem a capacidade de proteção das células da ação oxidante do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Novos testes serão realizados utilizando o complexo BSA-hemina zinco substituída e células da musculatura lisa CHO K1.

## REFERÊNCIAS

BROWN, J. R., Structural origins of mammalian albumin. *Fed Proc.*, v. 35, n. 10, p. 2141-2144, 1976.

MELOUN, B.; MORAVEK, L.; KOSTKA, V., Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett.*, v. 58, n. 1-2, p. 134-137, 1975.

PETERS, T. Jr., All about albumin: biochemistry, genetics and medical applications. Orlando: Academic Press., 1996.

SILVA, D.; CORTEZ, C.M.; LOURO, S.R.W.; Quenching of the intrinsic fluorescence of bovine serum albumin by chlorpromazine and hemin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.*, v. 37, p. 963-968, 2004.

VANDERKOOI, J. M.; ERECINSKA, M., Citocromo c interação com membranas. Espectros de absorção e emissão e características de ligação de ferro livre citocromo c. *Eur. J. Biochem.*, v.60, p. 199-207, 1975.

VANDERKOOI, J. M., ERECINDKA, M., CHANCE, B., Cytochrome c interaction with membranes. I. Use of a fluorescent chromophore in the study of cytochrome c interaction with artificial and mitochondrial membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, v. 154, p. 219-229, 1973.

YANG, F., XIA, X., LEI, H.Y., WANG, E.D., Hemin binds to human cytoplasmic arginyl-tRNA synthetase and inhibits its catalytic activity, *J Biol Chem.*, v. 285 n. 50, p. 39437-39446, 2010

## AGRADECIMENTOS

A minha família pelo apoio e compreensão, aos meus amigos do centro interdisciplinar de investigação bioquímica (CIIB) pelos ensinamentos e cooperação. Aos órgãos financiadores CNPq, FAPESP e Capes. A instituição de ensino UMC e especialmente aos orientadores Ivarne Tersariol e Tatiana Prieto por compartilharem comigo seus conhecimentos.