

Síntesis de tetrasulfoftalocianina de Fe (III) y su interacción con lisozima

Vicente Escobar Jonathan Osiris¹, García Sánchez Miguel Ángel¹,
Serratos Álvarez Iris Natzielly¹, Millán Pacheco César², Tello Solís Salvador Ramón^{1*}

¹Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Departamento de Química.
Avenida San Rafael Atlixco No. 186. Colonia Vicentina, México, D.F. CP 09340.

²Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Química,
Cuernavaca, Morelos, México, CP 62209

*srts@xanum.uam.mx

Fecha de aceptación: 06 de julio de 2015

Fecha de publicación: 23 de septiembre de 2015

RESUMEN

Las interacciones de proteínas con pequeñas moléculas son de importancia central, tanto para el diseño de nuevos compuestos farmacéuticos, como en una amplia variedad de procesos biológicos, por ejemplo, en terapia fotodinámica. Se ha encontrado que la lisozima ha sido ampliamente estudiada como agente anticanceroso, sin embargo, existen pocos reportes de su interacción con ftalocianinas. En este trabajo, se sintetizó una tetrasulfoftalocianina de Hierro (III) [μ -(OH) FeTSPc] y se estudió su interacción con lisozima por espectroscopia UV-vis en un regulador de fosfatos a pH 7. La tetrasulfoftalocianina se caracterizó por UV-vis (en la solución reguladora a pH 7) y FTIR, observándose la formación de un dímero. Se propone una estequiometría de unión entre la tetrasulfoftalocianina y la lisozima 1:1. A partir de este modelo se calculó la constante de unión y el cambio en la energía libre de Gibbs de unión (ΔG_u) a 25 °C. Además, se realizaron estudios *in silico* del acoplamiento molecular o *docking*, entre la lisozima y la sulfoftalocianina, para el cálculo de ΔG_u computacional del conformero más favorable, y así obtener un aproximación del sitio de unión entre μ -(OH) FeTSPc-lisozima.

Palabras clave: lisozima, tetrasulfoftalocianina de Fe (III), UV-vis, modelado.

ABSTRACT

Protein interactions with small molecules are of central importance, both for the design of new pharmaceutical compounds, and a wide variety of biological processes (photodynamic therapy). In this work, an Iron (III) tetrasulphophthalocyanine, [μ -(OH) FeTSPc], was synthesized and its interaction with lysozyme was studied by UV-Vis spectroscopy in a phosphate buffer at pH 7. Tetrasulphophthalocyanine was characterized by FTIR and UV-vis, showing the formation of a dimer. The results showed binding stoichiometry between tetrasulphophthalocyanine and lysozyme 1: 1. Considering this model the binding constant and the Gibbs free energy (ΔG_u) of binding was calculated. In addition, docking studies were performed to calculate the absolute binding free energy between μ -(OH) FeTSPc and lysozyme.

Key words: lysozyme, Fe (III) tetrasulphophthalocyanine, UV-vis, docking.

INTRODUCCIÓN

Los macrociclos tetrapirrólicos son sustancias presentes en estructuras como la clorofila, el grupo hemo de la sangre y los citocromos que, debido a su naturaleza, íntimamente ligada con la vida, presentan notables propiedades físicas y químicas.

Desde mediados del siglo pasado se analizó la posibilidad de usar derivados del grupo hemo de la sangre para el tratamiento de diversas afecciones humanas. Así mismo, en las últimas décadas ha surgido un gran interés en el uso de porfirinas y compuestos relacionados, tales como, ftalocianinas y clorinas, para su uso como agentes terapéuticos (Costa y Sílvia, 2002), debido a su fuerte absorción en el infrarrojo cercano, su baja o nula toxicidad, la localización selectiva en tumores, generación eficiente de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y su alta eficiencia fotoquímica (Idowu *et al.*, 2014). Los fotosensibilizadores son moléculas que pueden transferir su energía desde un estado excitado triplete a moléculas circunvecinas de oxígeno molecular, cuando son activados por luz de una longitud de onda específica (Nyokong, 2007). Esta transferencia de energía coadyuva a la formación de oxígeno singulete ($^1\text{O}_2$) y otras especies reactivas de oxígeno citotóxico que permiten la degradación de células cancerígenas mediante apoptosis o necrosis.

Las interacciones de proteínas con pequeñas moléculas son de importancia central tanto para el diseño de nuevos compuestos farmacéuticos, como en una amplia variedad de procesos biológicos (Tjelvar, *et al.* 2008). Por ejemplo, las enzimas, las cuales se unen a un sustrato y moléculas efectoras; proteínas transportadoras, tales como, hemoglobina o proteínas de almacenamiento como mioglobina, ambas se enlazan al oxígeno y muchas proteínas que actúan como reguladores uniéndose a iones hidronio.

La lisozima se encuentra en diversos fluidos biológicos y tejidos, incluyendo huevos de ave, en secreciones como lágrimas y saliva, y en secreciones cervicales. En 1963 se determinó la estructura primaria de la lisozima y en 1965 se publicó la estructura tridimensional por difracción de rayos X, de la lisozima obtenida del huevo de gallina. La lisozima posee una sola cadena de 129 aminoácidos, entrecruzada por cuatro puentes disulfuro. La estructura de la lisozima se compone de dos dominios o lóbulos, el dominio α con los residuos (1- 40 y 90-129) y el β dominio (41-89), unidos por una larga α -hélice donde se encuentra el sitio activo (Carrillo, 2013).

En este trabajo se sintetizó una tetrasulfoftalocianina de Hierro (III), [μ -(OH) FeTSPc], y se estudió su interacción con lisozima por espectroscopia UV-vis. Se propone una estequiometría de unión entre la tetrasulfoftalocianina y la lisozima 1:1. A partir de este modelo se calculó la constante de unión y el cambio en la energía libre de Gibbs de unión (ΔG_u) a 25 °C. Además, se realizaron estudios *in silico* del acoplamiento molecular o *docking*, para el cálculo de ΔG_u computacional del conformero más favorable, y así obtener una aproximación del sitio de unión entre μ -(OH) FeTSPc-lisozima. La importancia analizar este sistema, radica en la comprensión del mecanismo molecular de la interacción de la lisozima con la tetrasulfoftalocianina, que es una clave fundamental para contribuir al estudio de la terapia fotodinámica.

METODOLOGÍA

Síntesis y caracterización de μ -(OH) FeTSPc

La síntesis se llevó a cabo por el método reportado por García-Sánchez, 1993. El cual consiste en la condensación de ácido 4-sulfoftálico y urea, catalizada por molibdato de amonio, puestos en reflujo en nitrobenzono. El compuesto se lava con metanol y acetona y finalmente se sublima la urea remanente (figura 1). La especie μ -(OH) FeTSPc, se caracterizó por espectroscopia UV-vis (Cary, Varian) e IR (FTIR, Perkin-Elmer).

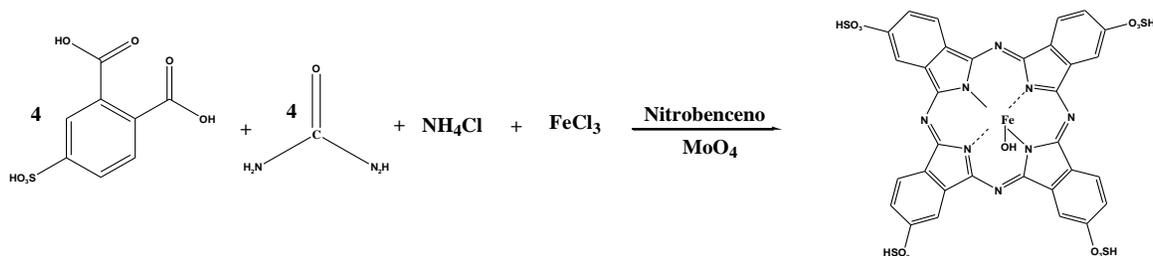
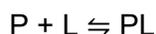


Figura 1. Esquema de reacción de la síntesis de tetrasulfoftalocianina de Hierro (III)

Interacción de lisozima- μ -(OH) FeTSPc, por UV-vis

Analizamos la interacción entre la lisozima (P) y la tetrasulfoftalocianina (L), asumiendo que las especies P y L reaccionan para formar el complejo lisozima-tetrasulfoftalocianina (PL), con una estequiometría 1:1, considerando que durante la interacción se alcanza el equilibrio (1):



Por lo que, la constante de unión K_U en términos de concentraciones molares se representa por (2):

$$K_U = \frac{[PL]}{[P][L]}$$

Consideramos una serie de disoluciones en las que se va añadiendo incrementos de L a una cantidad constante de P, donde P_0 es la concentración total de P (3):

$$[P] = P_0 - [PL]$$

Ahora bien, la expresión de la constante de equilibrio, se puede reordenar como (4):

$$\frac{[PL]}{[L]} = K_U [P] = K_U (P_0 - [PL])$$

La representación de $[PL]/[L]$ frente a $[PL]$, tendrá una pendiente igual a $-K_U$ y se denomina gráfico de Scatchard (Weder *et al.*, 1973).

Si se conoce $[PL]$, se puede hallar $[L]$, si L_0 es la concentración total de la tetrasulfoftalocianina, utilizando el balance de masas: $L_0 = [PL] + [L]$

Para conocer $[PL]$ y $[L]$ se utilizó espectroscopía UV-vis. P y PL absorben a la longitud de onda de 280 nm, pero L no. Las mediciones se hicieron en una celda de recorrido óptico de 1 cm. La absorbancia A de la muestra a 280 nm es la suma de las absorbancias de PL y P (5):

$$A = \epsilon_{PL}[PL] + \epsilon_P [P]$$

Donde ϵ_{PL} es la absorptividad molar de PL y ϵ_P es la absorptividad molar de P

Sustituyendo $[P] = P_0 - [PL]$ se puede escribir (6):

$$A = \epsilon_{PL}[PL] + \epsilon_P P_0 - \epsilon_{PL}[PL]$$

Pero $\epsilon_P P_0$ es A_0 la absorbancia inicial antes de añadir nada de L. Por lo tanto (7): $A = [PL](\epsilon_{PL} - \epsilon_P) + A_0$

Donde $\Delta\epsilon$ es igual a $\epsilon_{PL} - \epsilon_P$ y $\Delta A = A - A_0$ es la absorbancia observada menos la absorbancia inicial de P en cualquier punto de la valoración. Sustituyendo la expresión $[PL]$ de la ecuación, se obtiene la ecuación de Scatchard (8):

$$\frac{\Delta A}{[L]} = K_U \Delta \varepsilon P_o - K_U \Delta A$$

La representación de $\Delta A/[L]$ frente ΔA a es una línea recta de pendiente $-K_U$. La absorbancia de la disolución, medida mientras de valora P con L se puede utilizar para hallar la constante de equilibrio para la reacción de formación del complejo $P-L$.

Se realizó una titulación de lisozima (Sigma-Aldrich) 1.61×10^{-6} M (disuelta en fosfatos 5 mM pH 7), agregando cantidades crecientes de una solución "madre" de $\mu-(OH)$ FeTSPc 7.76×10^{-5} M (disuelta en fosfatos 5 mM pH 7). En cada adición se tomó la lectura del espectro UV-vis en un intervalo de 200 a 800 nm. Todas las mediciones se realizaron a una temperatura constante de 25°C, en un espectrofotómetro UV-vis HP equipado con un sistema de calentamiento tipo peltier.

En el espectro UV-vis de la especie $\mu-(OH)$ FeTSPc, se observó una tendencia lineal de la absorbancia en función del aumento de concentración a 635 nm ver figura 2. Por lo que, la determinación de la concentración de $\mu-(OH)$ FeTSPc libre, se realizó de manera independiente.

Estudios de acoplamiento (*docking*) de la interacción lisozima- $\mu-(OH)$ FeTSPc

La estructura cristalográfica de la lisozima con código *ID PDB 2LYZ.pdb* para los estudios de acoplamiento se obtuvo del *Protein Data Bank* y la estructura de $\mu-(OH)$ FeTSPc se construyó en *GaussView 5.0*. El *docking* se realizó con el programa *Autodock Vina* (Trott y Olson, 2010). A los mejores complejos se les realizó minimizaciones de energía con 100 pasos de *steepest descent* con el programa *CHARMM c35b2* y con el campo de fuerza *charmm36* parametrizado para proteínas.

Cálculos de energía de unión (ΔG_u)

Para la obtención de los mejores conformeros en los estudios de *acoplamiento*, se utilizó el programa *PDB2PQR* (Dolinsky *et al.* 2004), el cual prepara los archivos cristalográficos para cálculos electrostáticos en un medio continuo, de acuerdo a la METODOLOGÍA de Baker, 2004. Los archivos de salida tienen un formato similar al *PDB*, e incorporan los datos de carga y radio atómicos, utilizando como campo de fuerza *CHARMM*.

Para evaluar la energía libre de unión para el complejo lisozima- $\mu-(OH)$ FeTSPc, se determinaron separadamente las contribuciones de tipo electrostático y no polar, como se muestra a continuación (9):

$$\Delta G_u = \Delta G_{u,elec} + \Delta G_{u,apol}$$

y a su vez (10):

$$\Delta G_{u,elec} = \Delta G_{u,sol} + \Delta G_{u,coul}$$

donde el ΔG_u es la energía de unión y está en función de la energía electrostática, $\Delta G_{u,elec}$, y de la energía no electrostática o no polar, $\Delta G_{u,apol}$. A su vez el $\Delta G_{u,elec}$ está en función de la energía de solvatación ΔG_{u-sol} (que es la energía necesaria para retirar el solvente del sitio activo para que se una el ligando a la proteína) y de la energía coulombica, $\Delta G_{u,coul}$ (la energía de interacción entre las cargas de la proteína y las cargas del ligando). La componente electrostática se determinó resolviendo la ecuación no lineal de Poisson-Boltzman a través del programa *Adaptative Poisson-Boltzmann Solver (APBS)* descrito por Baker, 2004. La contribución al ΔG_u por parte de las interacciones no polares (ΔG_{u_nopol}) se evaluó como la energía liberada al ocultar el área de la interfase al solvente cuando se forma el complejo: dicha energía es proporcional al cambio en el área accesible al solvente y un parámetro semejante a la tensión superficial (γ), con un valor de $0.021 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ \AA}^{-2}$ para el agua: $\Delta G_{u_nopol} = \gamma \Delta ASA_{interfase}$. Se empleó el programa *Visual Molecular Dynamics (VMD)*, para calcular el área de la interfase que queda oculta del solvente en el complejo, a partir de los archivos *PDB* del complejo y de las moléculas individuales.

Integrando las contribuciones electrostáticas y no electrostáticas se determinó el ΔG_u de acuerdo a la ecuación (9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y caracterización de μ -(OH)FeTSPc

Es bien conocida la fuerte tendencia que presentan las ftalocianinas de dimerizarse en solución acuosa. En general, los procesos de agregación, reducen la absorptividad del monómero libre, lo cual puede causar una desviación a la ley de Lambert–Beer, este decremento en la banda de absorción del monómero, puede ocurrir simultáneamente con otros cambios, tales como un alargamiento y un cambio en el máximo de absorción o la formación de bandas adicionales relacionadas a la agregación de μ -(OH)FeTSPc. El espectro UV-vis del monómero presenta una banda de Soret cercana a los 350 nm y una banda de mayor intensidad Q cercana a los 670 nm (resultados no mostrados). En el espectro del dímero, figura 2, se observa un desplazamiento y ensanchamiento de la banda Q a 635 nm, además de un desplazamiento de la banda de Soret *al* aumentar la concentración.

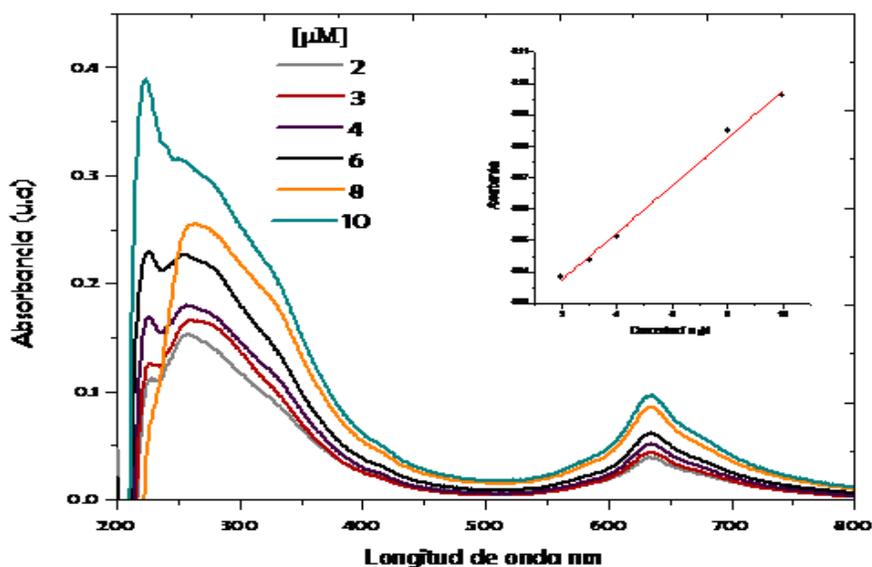


Figura 2. Espectros UV-vis de μ -(OH)FeTSPc, formando un dímero en disolución reguladora de fosfatos 5 mM pH 7. En el inset se muestra la relación lineal entre la absorbancia y la concentración seguida a 635 nm.

El espectro IR de sulfoftalocianinas se compone de gran parte de las bandas de asociadas a las vibraciones de los enlaces C=C del macrociclo aromático. Así mismo, se observa una gran banda asimétrica entre los 3700 y 2000 cm^{-1} que puede asociarse a las vibraciones del grupo hidroxilo axial al complejo de Hierro y aquellos de los grupos sulfo (HOSO_2^{-1}) de la sulfoftalocianina (figura 3).

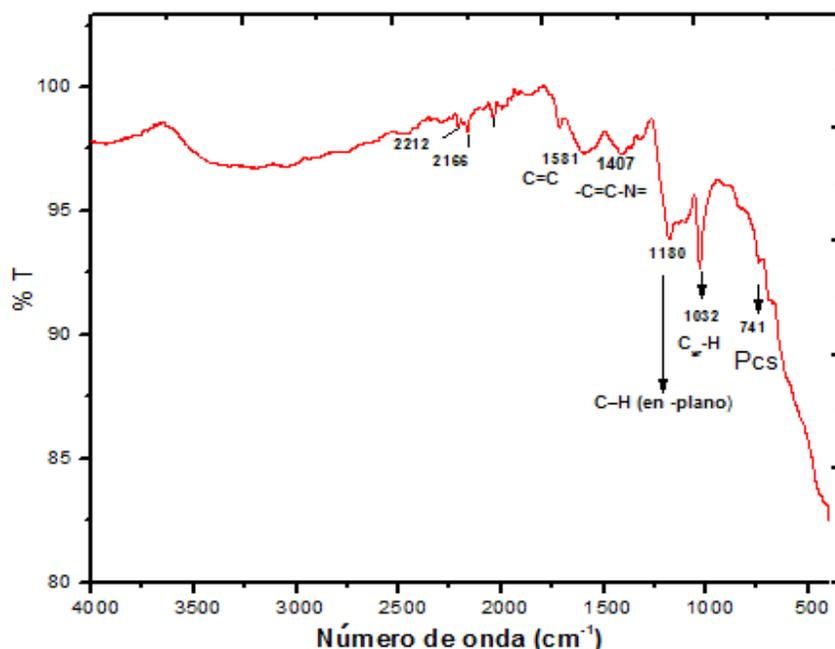


Figura 3. Espectro FTIR de la μ -(OH)FeTSPc

Interacción de lisozima- μ -(OH)FeTSPc

La máxima absorción de la lisozima se presentó a los 280 nm (figura 4) y se estableció que el aumento de absorbancia, tras la adición de cantidades crecientes de μ -(OH)FeTSPc, se debía a la formación del complejo (PL) (figura 5). Los datos de la representación de $\Delta A/[L]$ en función de ΔA se ajustaron a una recta con coeficiente de correlación R^2 0.998, por lo que se asume que la estequiometría de la interacción lisozima sulfoftalocianina es 1:1. La constante de unión K_u se obtuvo de la pendiente del gráfico de Scatchard (figura 6), el valor de K_u fue de 2.2×10^4 ($\square\square\square$ 240) M^{-1} , y con $\Delta G_u = -24.9$ kJ/mol, por lo que el complejo formado (PL), es termodinámicamente estable.

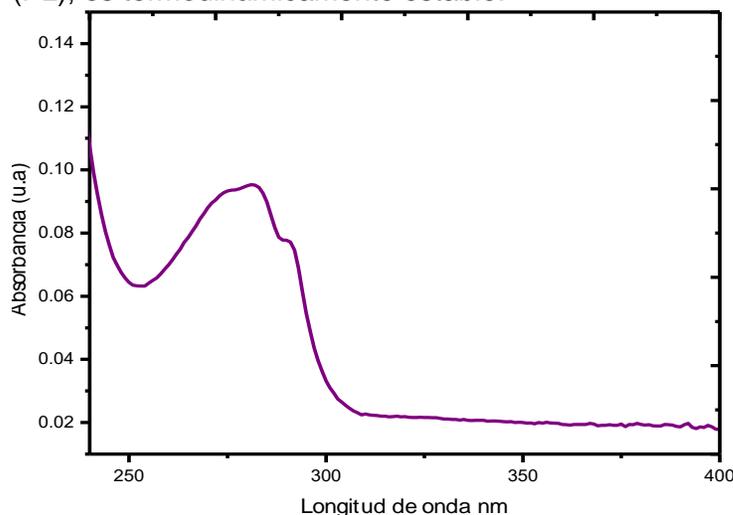


Figura 4. Espectro UV-vis de lisozima en regulador de fosfatos 5 mM pH 7

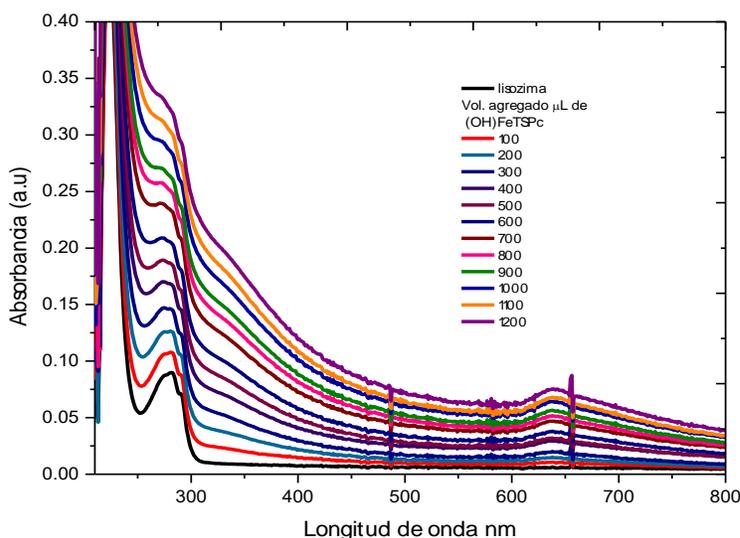


Figura 5. Espectros UV-vis de la titulación de lisozima con μ -(OH)FeTSPc, (volumen agregado de 100 a 1200 μ L)

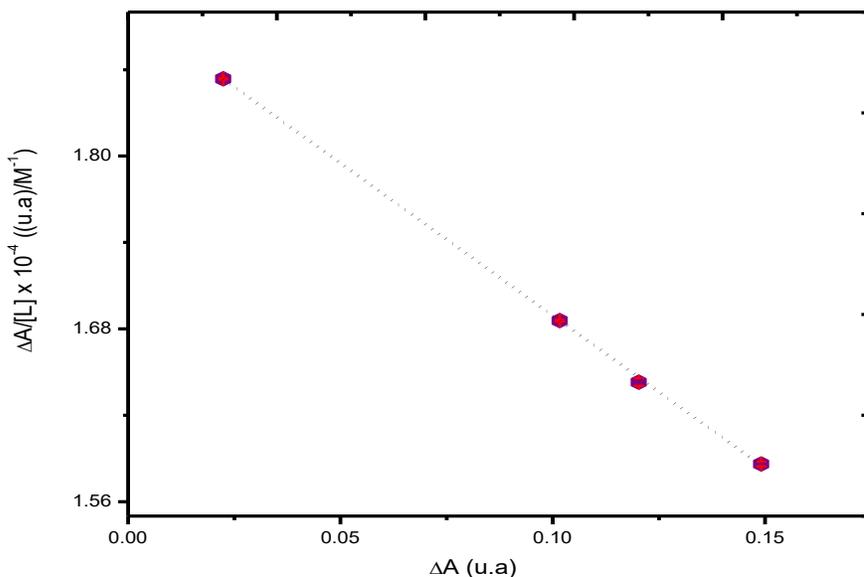


Figura 6. Gráfico de Scatchard para la determinación de la constante de unión lisozima- μ -(OH)FeTSPc

Análisis de la interacción molecular lisozima- μ -(OH)FeTSPc a través de los cálculos de energía electrostática computacional

Se realizaron estudios de *docking* utilizando la estructura cristalográfica de *2LYZ.pdb* con el monómero de μ -(OH)FeTSPc, generándose veinte conformeros. Posteriormente se determinaron cálculos de energía de unión (ΔG_u) para estos conformeros a través de la contribución electrostática y no electrostática (Serratos-Álvarez, 2011). En la tabla 1 se presentan los cálculos de las contribuciones de los tres mejores modelos en la interacción lisozima- μ -(OH)FeTSPc.

Tabla 1. Energías de unión (ΔG_u) para el sistema lisozima- μ -(OH)FeTSPc determinado por APBS and VMD.

Sistema	ΔG_{solv} (kJ/mol)	ΔG_{coul} (kJ/mol)	ΔG_{np} (kJ/mol)	ΔG_u^* (kJ/mol)	Puentes de Hidrógeno a 5 Å
Modelo 1	63	-1332	-14	-1283	6
Modelo 2	236	-1211	-15	-990	3
Modelo 3	246	-1140	-16	-910	3

* $\Delta G_u = \Delta G_{\text{solv}} + \Delta G_{\text{coul}} + \Delta G_{\text{np}}$

En la tabla 1 se puede observar que las interacciones electrostáticas gobiernan la unión lisozima-ftalocianina, principalmente las interacciones coulombicas y ligeramente las interacciones no polares. Consideramos que el modelo 1 es el más favorable, $\Delta G_u = -1283$ kJ/mol, debido a que presenta más puentes de hidrógeno respecto a los modelos 2 y 3. Además, en el modelo 1 un átomo del oxígeno del SO_3^{2-} de μ -(OH)FeTSPc interactúa con la carga positiva del átomo de N de Lys 116, lo que establece un ambiente electrostático favorable, que se refleja en el valor del ΔG_u .

A continuación se muestran los posibles sitios de unión de la lisozima- μ -(OH)FeTSPc de los tres mejores conformeros.

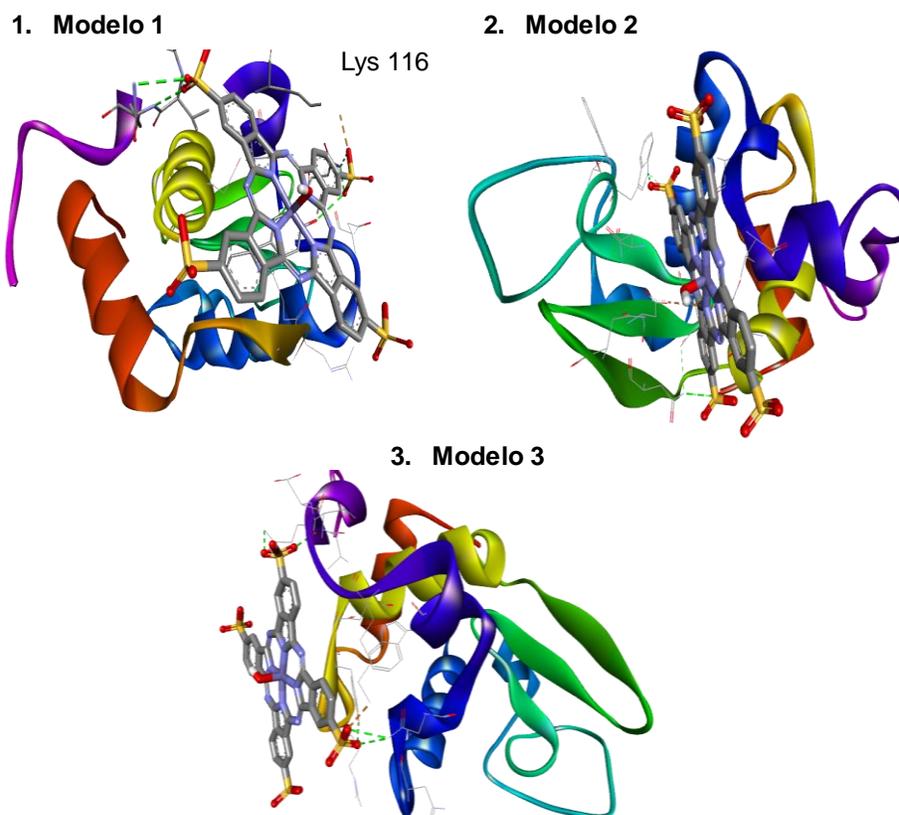


Figura 7. Resultados de los tres mejores conformeros obtenidos por estudios de acoplamiento de lisozima (ID PDB 2LYZ) con μ -(OH)FeTSPc. A) Modelo 1, B) Modelo 2 y C) Modelo 3.

CONCLUSIONES

Se sintetizó y caracterizó espectroscópicamente la especie μ -(OH)FeTSPc, la forma dimérica es la que predomina en solución, en un regulador de fosfatos 5 mM pH 7. Además, se estudió la interacción de la lisozima con μ -(OH)FeTSPc por espectroscopía ultravioleta-visible. La estequiometría de la interacción cumple con un modelo de unión en una relación molar 1:1. A partir de un gráfico de Scatchard, se calculó la constante de unión del complejo lisozima-tetrasulfoftalocianina. Por medio de un análisis computacional se confirmó que la interacción lisozima- μ -(OH)FeTSPc, es energéticamente favorable.

REFERENCIAS

- Baker N. A. (2004). Poisson-Boltzmann Methods For Biomolecular Electrostatics. *Methods Enzymol*, 383: 94-118.
- Carrillo W. (2013). Lysozyme: Antibacterial Activity And Allergenicity. *Actualización en Nutrición*, 14: 314-326.
- Costa Y., Silvia M. B. (2002). Spectroscopic Studies On The Interaction Of A Water Soluble Porphyrin And Two Drug Carrier Proteins. *Biophysical Journal*, 82: 1607–1619.
- Dolinsky J., Li H., Jensen J. H., Baker N. A., Szczodrowski J., Nielsen P., Klebe G. (2004). Pdb2pqr: An Automated Pipeline For The Setup Of Poisson-Boltzmann Electrostatics Calculations. *Nucleic Acids Res*, 32: 665- 667.
- García-Sánchez M. A. (1993). Síntesis y caracterización de complejos macrocíclicos mixtos lantanoides. Tesis de Maestría en Química, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Idowu M. A., Arslanoğlu Y., Nyokong T. (2014). Spectral Properties And Photophysical Behaviour Of Water Soluble Cationic Mg (Ii) And Al (Iii) Phthalocyanines. *Cen Eur J Chem*, 12: 403-415.
- Nyokong T. (2007) Effects Of Substituents On The Photochemical And Photophysical Properties Of Main Group Metal Phthalocyanines. *Coor. Chem. Rev*, 251: 1707-1722.
- Serratos-Álvarez I. N. (2011). Evaluación De Las Interacciones Electroestáticas En Complejos Enzima-Inhibidor: La Triosafosfato Isomerasa Con Inhibidores Fosforilados, Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México.
- Tjelvar S.G.O., Williams M. A., Ladbury J. (2008). The Thermodynamics of Protein–Ligand Interaction and Solvation: Insights for Ligand Design. *J. Mol. Biol*, 384: 1002–1017.
- Trott O., Olson J. A. (2010). Autodock Vina: Improving The Speed And Accuracy Of Docking With A New Scoring Function, Efficient Optimization, And Multithreading. *J Comput Chem*, 3: 455–461.
- Weder H., Schildknecht J., Lutz A. R., Kesselbing P. (1973). Determination Of Binding Parameters From Scatchrads Plots. *Eur. J. Biochem*, 42: 475-481.