

ESTUDIO DE LA UNIÓN DE OXITETRACICLINA (OT) A SEROALBÚMINAS HUMANA (HSA) Y BOVINA (BSA)

Serrano Caballero, J. M.* y Cárceles Rodríguez, C. M.**

* Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Veterinaria de Córdoba.

** Cátedra de Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Facultad de Veterinaria de Murcia.

Recibido: 30 abril

Aceptado: 18 noviembre

RESUMEN

Se estudia la interacción entre oxitetraciclina (OT) y seroalbúminas humana (HSA) y bovina (BSA) mediante diálisis en el equilibrio. El método de determinación de OT ha sido el propuesto por Garrat (1964).

La OT se fija a la HSA en 0'2 centros de unión por molécula con una constante de asociación comprendida entre $2'5 \times 10^5$ y $1'0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, en tanto que se une a la BSA en 1 centro de unión por molécula con una constante de asociación comprendida entre $1'5 \times 10^4$ y $1'8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Palabras clave: Oxitetraciclina, seroalbúmina humana (HSA), seroalbúmina bovina (BSA), diálisis en el equilibrio, constante de asociación, centros de unión.

SUMMARY

Interactions between oxytetracycline (OT) and human and bovine serum albumins (HSA and BSA) were studied by equilibrium dialysis. The OT determination method was the proposed by Garrat (1964).

The OT binds to the HSA and the BSA by 0'2 and 1 binding sites per molecule respectively. The association constant ranges from $2'5 \times 10^5$ to $1'0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ and from $1'5 \times 10^4$ to $1'8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ for the respective HS and BS albumins.

Keywords: Oxytetracycline, human serum albumin (HSA), bovine serum albumin (BSA), equilibrium dialysis, association constant, binding sites.

INTRODUCCIÓN

La oxitetraciclina (OT) es un antibiótico de amplio espectro del grupo de las tetraciclinas. Su utilización en el tratamiento de las enfermedades infecciosas del hombre y de los animales es profuso, además de su empleo en nutrición animal como aditivo.

Del grupo de las tetraciclinas, la OT es una de las que presenta una mayor solubilidad en agua como indican SCHACH y YEARY (1963). Estos autores comparan la distribución clorofórmico/agua de seis antibióticos de este grupo y encuentran un coeficiente menor para la OT

que para las restantes tetraciclinas estudiadas a cualquier valor de pH.

Esta característica físico-química de solubilidad en agua y disolventes orgánicos, va a modular su interacción con las proteínas plasmáticas junto con las características de la propia proteína y las condiciones del ensayo (EDSALL y WYMAN, 1958).

En efecto, su mayor solubilidad en agua disminuye la unión con las proteínas circulantes. SCHACH y YEARY (1963) encuentran que la OT se une a las proteínas plasmáticas del perro en un 29%, mientras que a las del hombre lo hace en un 35%. De las restantes tetraciclinas estu-

diadas, estos autores encuentran que la 6-metilenoxtetraciclina y la 6-deoxioxtetraciclina son las que se unen en mayor proporción a las proteínas plasmáticas del perro y del hombre respectivamente.

PILLOUD (1973) encuentra que la OT tiene una capacidad de fijación máxima de 3.13×10^{-6} M/g de proteína plasmática de bovino, valor que no está muy alejado del que este mismo autor encuentra para el caballo y que cifra en 3.9×10^{-6} M/g de proteína. En estudios de fijación sobre proteínas plasmáticas de búfalo (*Bubalus bubalis*), VARMA y PAUL (1983) encuentran que la OT se une a estas proteínas en un 42%.

En el presente trabajo abordamos el estudio de la unión de oxtetraciclina (OT) a las albúminas séricas humanas (HSA) y bovinas (BSA) al objeto de determinar los parámetros cinéticos de dicha interacción.

MATERIAL Y MÉTODOS

Hemos empleado la técnica de diálisis en el equilibrio utilizando membrana de celofán Vis-king Dialysis Tubing Type 8/32 de Serva para la elaboración de las bolsas. El acondicionamiento de las mismas se ha realizado como proponen RUDMAN y KENDALL (1957) modificado por SERRANO y cols. (1984).

La HSA (Behringwerke A. G. Marburg Lahn) y la BSA (Merck) se han utilizado a la concentración de 5×10^{-5} M. La concentración de OT (Pfizer) ha oscilado entre 4.47×10^{-6} y 1.34×10^{-4} M. Todas las soluciones, de proteína y de antibiótico, se han realizado en un tampón de fosfatos 0.065 molar de pH 7.4.

Una vez acondicionadas las bolsas de celofán se han llenado con 1 ml de la solución de albúmina humana o bovina y se han cerrado. Tras someterlas durante 48 horas a diálisis frente a tampón a 4° C se han dializado con 9 ml de las soluciones de OT correspondientes. Todos los ensayos se han realizado por triplicado para cada tipo de albúmina y para cada concentración de antibiótico al objeto de utilizar los valores medios de los mismos. La diálisis se ha mantenido durante 22 a 24 horas a temperatura ambiente.

La determinación cuantitativa de OT se ha realizado en un espectrofotómetro Bausch and Lomb Spectronic 2000. El método empleado ha sido el de GARRAT (1964) tras comprobar que la albúmina no interfiere en la determinación y cuantificación del producto.

RESULTADOS

Con los valores medios de absorbancia de las tres series realizadas para cada interacción OT-albúmina, calculamos las concentraciones de antibiótico empleando las rectas de calibrado correspondientes. El porcentaje de recuperación medio de OT ha sido de 96.79 ± 2.62 (media \pm I.C. 95%).

El cuadro 1 muestra los valores medios de concentración de antibiótico total, libre y conjugado a HSA, que corresponden respectivamente a las concentraciones en el interior de las bolsas de diálisis, a las de los tampones externos y a la diferencia entre ambos valores. También se indican en este cuadro los porcentajes de unión para cada concentración.

CUADRO I
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE OXITETRACICLINA TOTAL, LIBRE Y CONJUGADA A SEROALBÚMINA HUMANA Y PORCENTAJES DE UNIÓN

CONCENTRACIONES MICROMOLARES DE OXITETRACICLINA			PORCENTAJE DE UNIÓN
TOTAL	LIBRE	CONJUGADA	
9.48	2.93	7.09	74.79
12.58	5.13	7.45	59.22
15.69	7.67	8.02	51.12
19.00	10.73	8.27	43.53
46.95	38.37	8.58	18.27
75.11	66.12	8.99	11.97
105.96	94.71	11.25	10.62
128.32	117.92	10.40	8.10

El cuadro 2 es similar al cuadro 1 con la diferencia de que en este caso se refiere a la BSA.

Al relacionar la concentración de fármaco unido por mol de proteína con la concentración de fármaco libre, se obtiene la función de unión, que se deduce de la ley de acción de masas, y cuya expresión es la siguiente:

$$r = n \frac{Ka(F)}{1 + Ka(F)}$$

en la que «r» es la función unión, «n» el número de sitios de unión por molécula de proteína, «Ka» la constante de asociación y «(F)» la concentración molar de fármaco libre. Los valores de «(F)» y de «r» para cada albúmina se muestran en el cuadro 3.

Los parámetros cinéticos de las interacciones OT-HSA y OT-BSA se calculan mediante los

CUADRO 2
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE OXITETRACICLINA TOTAL, LIBRE Y CONJUGADA A LA SEROALBÚMINA BOVINA Y PORCENTAJES DE UNIÓN

CONCENTRACIONES MICROMOLARES DE OXITETRACICLINA			PORCENTAJE DE UNIÓN
TOTAL	LIBRE	CONJUGADA	
6'78	3'87	2'91	42'92
10'72	6'51	4'21	39'27
15'48	9'56	5'92	38'24
18'58	10'93	7'65	41'17
53'37	36'57	16'80	31'48
86'91	63'48	23'43	26'96
119'00	89'85	29'15	24'50
144'05	113'17	30'88	21'44

CUADRO 3
VALORES MEDIOS DE CONCENTRACIÓN DE OXITETRACICLINA LIBRE $\mu\text{M/L}$ Y DE LA RELACIÓN MOLAR PARA LA INTERACCIÓN CON AMBAS ALBÚMINAS

ALBÚMINA HUMANA		ALBÚMINA BOVINA	
CONCENTRACIÓN LIBRE	RELACIÓN MOLAR	CONCENTRACIÓN LIBRE	RELACIÓN MOLAR
2'39	0'1418	3'87	0'0582
5'13	0'1490	6'51	0'0842
7'67	0'1604	9'56	0'1184
10'73	0'1654	10'93	0'1530
38'37	0'1716	36'57	0'3360
66'12	0'1798	63'48	0'4686
94'71	0'2250	80'85	0'5830
117'92	0'2080	113'17	0'6176

procedimientos de linealización de Lineweaver-Burk, de Klotz y de Scatchard (KLOTZ y HUNSTON, 1971) y sus valores aparecen en el cuadro 4.

DISCUSIÓN

En el cuadro 1 se observa que en la interacción OT-HSA existe poca diferencia entre las concentraciones totales y las libres, lo que nos indica que cuando aumentamos la concentración de fármaco, éste se mantiene, en su mayor parte, en forma libre, es decir, que los incrementos de antibiótico fijado a la seroalbúmina son pequeños aunque la concentración total de

OT sea elevada. Este hecho, hace que los porcentajes de unión sean altos en las concentraciones más bajas y descendan de manera marcada, hasta valores bajos, en las concentraciones más elevadas.

Por otro lado, en la interacción OT-BSA aparecen unas diferencias mayores entre las concentraciones totales y las libres, como se observa en el cuadro 2, por lo que los descensos de los porcentajes de unión conforme aumenta la concentración total de fármaco son menos acusados que en el caso anterior.

En consecuencia, la relación molar en la interacción OT-HSA se incrementa ligeramente al aumentar la concentración de oxitetraciclina, mientras que en la interacción OT-BSA la relación molar aumenta de manera más marcada (cuadro 3), lo que se traduce en diferencias significativas en los parámetros cinéticos de ambas interacciones.

Al relacionar los valores de la función unión con la concentración libre de OT por cualquiera de los tres procedimientos citados, se observa un buen ajuste a la línea recta en el caso de la interacción con seroalbúmina bovina. Ello se desprende de los valores del coeficiente de correlación lineal simple que presenta, en todos los casos, unos niveles de significación estadística superiores al 99'9 por ciento ($p < 0'001$) como se aprecia en el cuadro 4.

En el caso de la interacción con HSA, sin embargo, sólo se demuestra un ajuste a la línea recta, que sea óptimo, en el procedimiento de

CUADRO 4
PARÁMETROS CINÉTICOS DE LAS INTERACCIONES OXITETRACICLINA-ALBÚMINA (HUMANA Y BOVINA) DEDUCIDOS POR LOS PROCEDIMIENTOS DE LINEALIZACIÓN MÁS USUALES

	OXITETRACICLINA-ALBÚMINA HUMANA		
	LINEWEAVER-BURK	KLOTZ	SCATCHARD
Correlación	0'8255*	0'9933***	-0'7608*
N.º centros	0'19	0'21	0'21
Cte. asoc.	$1'0 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$2'5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$	$5'3 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$
	OXITETRACICLINA-ALBÚMINA BOVINA		
	LINEWEAVER-BURK	KLOTZ	SCATCHARD
Correlación	0'9963***	0'9951***	-0'9750***
N.º centros	0'84	0'93	0'96
Cte. asoc.	$1'8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$1'6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$	$1'5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$

* Significación del 95% ($p < 0'05$).

*** Significación superior al 99'9% ($p < 0'001$).

Klotz, en el que la significación estadística del coeficiente de correlación lineal simple es de 99.9% como en el caso de la interacción con BSA. En los restantes procedimientos, Lineweaver-Burk y Scatchard, el ajuste a la línea recta es menor, aunque también significativo con niveles del 95% ($p < 0.05$).

El número de sitios de unión por molécula de seroalbúmina humana que se obtiene por los tres procedimientos es de 0.2, lo que a nuestro entender indica que tan sólo una de cada cinco moléculas de albúmina es capaz de fijar a una molécula de antibiótico. Cifras inferiores a la unidad para el valor de «n» se encuentran en ocasiones, así DAVISON y SMITH (1961) obtienen valores de 0.4 en la interacción entre el ácido benzoico y la albúmina bovina, y de 0.3 para el ácido salicílico y los restantes isómeros posicionales del ácido hidroxibenzoico con la citada albúmina.

La constante de asociación de la OT y la HSA toma valores diferentes según el procedimiento de linealización que se considere (cuadro 4). Dichos valores están comprendidos entre 2.5×10^5 y $1.0 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$.

En lo referente a la interacción OT-BSA, los valores de «n» y de «Ka» que se obtienen son muy similares en los tres procedimientos de linealización. Encontramos, en este caso, que el número de sitios de unión de la oxitetraciclina a la albúmina bovina es de uno por molécula con una constante de asociación comprendida entre 1.5×10^4 y $1.8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$.

Para las interacciones estudiadas no se manifiesta ningún tipo de cooperatividad a las concentraciones empleadas, aunque en lo referente a la interacción OT-HSA podría existir cierto grado de cooperatividad negativa por el hecho de que en los procedimientos de Lineweaver-Burk y de Scatchard aparece cierta curvatura, cóncava respecto al eje de abscisas para el de Lineweaver-Burk y convexa respecto del origen de ordenadas para el de Scatchard, lo que hace que el ajuste a la línea recta sea menos óptimo que en el procedimiento de Klotz.

Las diferencias encontradas entre ambas interacciones se deben, al menos parcialmente, a

la diferente procedencia específica de las seroalbúminas como indican EDSALL y WYMAN (1958). Ello se ha manifestado también en otras interacciones como la de silimarina con HSA y BSA (SERRANO y cols., 1985), en la que se obtienen distintos valores de «n» y de «Ka» para cada albúmina.

BIBLIOGRAFÍA

- DAVISON, C., SMITH, P. K. (1961): «The binding of salicylic acid and related substances to purified proteins». *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 133, 161-170.
- EDSALL, J. T., WYMAN, J. (1958) «Biophysical chemistry», vol. 1, Academic Press, New York. (Citado por RUDMAN, D., BIXLER II, T. F., DEL RÍO, A. E. (1973): «Effect of free fatty acids on binding of drugs by bovine serum albumin, by human serum albumin and by rabbit serum», *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 176, 261-272).
- GARRAT, D. C. (1964): «The quantitative analysis of drugs». 3rd ed., Chapman and Hall L., London.
- KLOTZ, I. M., HUNSTON, D. L. (1971): «Properties of graphical representations of multiple classes of binding sites», *Biochemistry*, 10: 16, 3.065-3.069.
- PILLOUD, M. (1973): «Pharmacokinetics, plasma protein binding and dosage of oxytetracycline in cattle and horses». *Res. Vet. Sci.* 15, 224-230.
- RUDMAN, D., KENDALL, F. E. (1957): «Bile acid content of human serum. II. The binding of cholic acids by human plasma proteins», *J. Clin. Invest.* 36, 538-542.
- SCHACH VON WITTENAU, M., YEARY, R. (1963): «The excretion and distribution in body fluids of tetracyclines after intravenous administration to dogs», *J. Pharmacol. Exp. Therap.* 140, 258-266.
- SERRANO, J. M., CABANAS, L. F., SANTIAGO, D. (1984): «Estudio de la unión de silimarina a proteínas plasmáticas. II. Proteínas de cerdo, ovino, caprino, bovino y hombre», *Arch. Zootec.* 125, 89-95.
- SERRANO, J. M., QUIÑONERO, M., DE LA PEÑA, M. L. (1985): «Interacción de silimarina con seroalbúminas humana (HSA) y bovina (BSA)», *Arch. Farmacol. Toxicol.* 11, 135-139.
- VARMA, K. J., PAUL, B. S. (1983): «Pharmacokinetics and plasma protein binding (in vitro) of oxytetracycline in buffalo (*Bubalus bubalis*)», *Am. J. Vet. Res.* 44, 497-499.