

PROPRIEDADES ESTRUTURAIS DE HEMOGLOBINAS DE PEIXES MARINHOS. II – CARACTERIZAÇÃO ANTIGÊNICA⁽¹⁾

Maria Laise Chaves Vieira⁽²⁾
Aila Maria S. Fontenele Duarte⁽³⁾
Maria do Socorro F. Silva Silveira⁽³⁾
Hélio Frota Vieira⁽²⁾

Laboratório de Ciências do Mar
Universidade Federal do Ceará
Fortaleza – Ceará – Brasil

As hemoglobinas de peixes exibem o maior grau de diversidade estrutural e funcional dentre todas as hemoglobinas de vertebrados (Reichlin & Davis, 1979a). Essa diversidade se deve, principalmente, ao baixo teor de oxigênio dissolvido na água e à sua não uniformidade, pois dependendo de vários fatores como temperatura, profundidade, concentração salina, etc., os níveis do oxigênio dissolvido variam grandemente. A adaptação dos peixes a essas variações condiciona a existência de formas múltiplas de hemoglobinas em uma mesma espécie, bem como uma diversidade estrutural e, conseqüentemente, grandes alterações nas propriedades funcionais, tanto em um mesmo animal, como também nas diferentes espécies (Riggs, 1970).

Estudo de uma molécula por testes imunoquímicos permite avaliar, com grande sensibilidade, diferenças estruturais muitas vezes não perceptíveis através de outras técnicas, uma vez que esses

testes possibilitam até reconhecer, em proteínas, a substituição de um simples aminoácido (Ingram, 1975).

A caracterização antigênica de proteínas pode ser vista como uma técnica que permite diferenciar moléculas através de sua superfície externa (Reichlin, 1975). Deste modo, os anticorpos preparados reagem com seu antígeno homólogo, através de todos seus determinantes antigênicos e são capazes de reagir com grande percentagem de determinantes antigênicos do antígeno heterólogo, o que permite avaliar, pela reação, o grau de semelhança antigênica entre essas proteínas.

Usando técnicas imunoquímicas para estudo comparativo de hemoglobinas, vários autores, através de soro anti-hemoglobina de uma determinada espécie, evidenciaram a existência de reações cruzadas dessa molécula com as de outros animais da mesma espécie, como é o caso das hemoglobinas de mamíferos (Cradock – Watson, 1967), de répteis da espécie *Galapagos iguana* (Higgins & Rand, 1975), de tartarugas terrestres (Lykakys, 1974), de alguns anfíbios (Jurd & Maclean, 1969; Maniatis & Ingram, 1971; Vieira *et al.*, 1981; e Vieira *et al.*, 1982) e de peixes (Reichlin & Davis, 1979a/b; Portus *et al.*, 1983).

(1) Trabalho subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(2) Pesquisador do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

(3) Bolsista de Aperfeiçoamento do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Outras reações cruzadas foram observadas entre hemoglobinas normais e anormais, como é o caso das hemoglobinas humanas anormais *S*, *M*, *Kansas*, *Chesapeake* e *Boston*, que reagiram cruzadamente com soro anti-hemoglobina normal A_1 (Reichlin, 1972) e a hemoglobina fetal *F* com anti-hemoglobina normal A_1 (Reichlin, 1970).

Os testes imunquímicos comparativos de hemoglobinas são utilizados, uma vez que essas moléculas exigem um eficiente poder imunogênico, tanto em sua forma tetramérica como através de suas cadeias isoladas (Askonas & Smith, 1964), permitindo a produção de sôros hiper-ímmunes de alta ou baixa especificidade, dependendo do tempo gasto na imunização.

Dentre os diferentes testes imunquímicos, o mais utilizado nos estudos comparativos é o teste de imunodifusão dupla bidimensional (Ouchterlony, 1958), não só por sua grande sensibilidade como também pela possibilidade de se realizar testes de identidade em que, além das reações cruzadas, pode-se observar se os antígenos testados mostram identidade total, parcial ou não identidade entre si.

Nesse trabalho, procuramos evidenciar um relacionamento antigênico das hemoglobinas de diferentes espécies de peixes marinhos através da reação antígeno-anticorpo, usando soro anti-hemoglobina.

MATERIAL E MÉTODOS

Nesse trabalho foram utilizados soro de carneiro anti-hemoglobina de *Balistes vetula*, obtido em laboratório (Vieira & Vieira, 1983), e hemolisado de eritrócitos de alguns peixes marinhos adultos, capturados na costa do Estado do Ceará, Nordeste do Brasil.

O hemolisado de eritrócitos foi preparado utilizando-se hemácias lavadas 3-4 vezes com solução de cloreto de sódio 0,2 M contendo EDTA 10^{-3} M. Essas hemácias foram colocadas em solu-

ção de EDTA 10^{-3} M e, após 20-30 minutos de agitação suave, foram centrifugadas a 3.000 rpm, por 15 minutos. O sobrenadante foi colhido e utilizado como antígeno nas reações de imunodifusão.

A reação de imunodifusão dupla bidimensional foi realizada em gel de agar a 1% em tampão fosfato 0,01 M contendo cloreto de sódio 0,15 M, pH 7,0, segundo Ouchterlony (1958). O preparo das lâminas foi feito utilizando-se cerca de 4 ml de agar fundido, colocado cuidadosamente sobre uma lâmina de vidro limpa e seca. Após a solidificação desse agar foram feitos 7 orifícios de 3 mm de diâmetro em sua superfície, de modo que se obtivesse um orifício central e 6 periféricos, todos equidistantes entre si e do central, cerca de 0,5 cm. Nesses orifícios foram colocados os reativos para o teste sendo, no central, o soro anti-hemoglobina de *B. vetula* e em cada um dos periféricos, um dos homolisados a ser testado.

Foram utilizados, nessas reações, três diferentes soros anti-hemoglobina de *B. vetula*, cada um com uma especificidade diferente, isto é, soro obtido após 3, 4 e 12 meses de inoculação.

Após a colocação dos reativos, as lâminas foram incubadas por 24-48 horas em câmara úmida (100% de umidade relativa do ar atmosférico), a temperatura ambiente. As reações foram observadas com auxílio de um megatoscópio onde uma linha de precipitação era evidenciada entre o orifício central (que continha o soro) e o orifício periférico (que continha o hemolisado reativo). As hemoglobinas que não mostraram linha de precipitação, isto é, deram reação negativa, foram consideradas não apresentadoras de reação cruzada com o soro em estudo.

Essas lâminas foram desidratadas e coradas com solução de comassie-blue a 2%, a fim de melhor evidenciar a linha de precipitação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A semelhança antigênica das hemoglobinas de algumas espécies de peixes marinhos baseada em sua reatividade, ou não, com o soro de carneiro anti-hemoglobina de *B. vetula*, através de testes de imunodifusão dupla bidimensional, mostrou a existência de reação em 5 homolisados estudados quando foi usado soro de maior especificidade, isto é, soro obtido após 3 meses de imunização. Quando foi usado o soro obtido após 4 meses, observamos a reatividade desse soro com um maior número de hemolisados de eritrócitos, enquanto que o soro obtido após 12 meses de inoculação foi capaz de reconhecer 14 dos 19 diferentes hemolisados testados (tabela I), mostrando reação cruzada até com hemoglobina de anfíbio.

Os resultados desses testes, expressos como positivo ou negativo, estão na tabela I, onde, além dos hemolisados de eritrócitos de peixes marinhos, estão apresentados também os resultados com hemolisado de eritrócitos do anfíbio *Bufus marinus* e de eritrócitos humanos.

Em vista desses resultados, podemos observar que, após um longo período de imunização, a obtenção de soro anti-hemoglobina de *B. vetula* de baixa especificidade foi conseguida, e o mesmo foi capaz de reconhecer a maioria das hemoglobinas testadas. Esse soro, pouco específico, permite avaliar a semelhança antigênica de algumas hemoglobinas, uma vez que sua capacidade de produzir reações cruzadas é grande, discriminando somente aquelas que sejam, antigenicamente, bastante diferenciadas. Quando foi usado o soro de maior especificidade,

TABELA I

Reação de imunodifusão bidimensional utilizando soro anti-hemoglobina de *Balistes vetula*, obtido 3 meses (AS - 3), 4 meses (AS - 4) e 12 meses (AS - 12) após o início da imunização, e hemolisado de eritrócitos de diferentes espécies de peixes marinhos. Os resultados estão expressos como positivo (reativo) e negativo (não reativo).

Família	Espécie	Soro anti-Hb <i>B. vetula</i>		
		AS - 3	AS - 4	AS - 12
Balistidae	<i>Balistes vetula</i>	+	+	+
Orectolobidae	<i>Gynglymostoma cirratum</i>	-	-	-
Gymnuridae	<i>Gymnura micrura</i>	-	-	-
Scombridae	<i>Euthynnus alletteratus</i>	-	-	+
	<i>Scomberomorus brasiliensis</i>	-	-	+
	<i>Scomberomorus cavalla</i>	-	-	+
Carangidae	<i>Selar crumenoptalmus</i>	-	-	+
	<i>Caranx hippos</i>	-	-	+
	<i>Caranx crysos</i>	+	+	+
Rachycentridae	<i>Rachycentron cariadus</i>	-	-	-
Chaetodontidae	<i>Chaetodipterus faber</i>	-	-	-
Malacanthidae	<i>Malacanthus plumieri</i>	+	+	+
Serranidae	<i>Epinephelus morio</i>	-	+	+
Sciaenidae	<i>Polyclemus brasiliensis</i>	+	+	+
Pomadasyidae	<i>Haemulon plumieri</i>	-	-	+
Coryphaenidae	<i>Coryphaena hippurus</i>	-	-	+
Lutjanidae	<i>Ocyurus chrysurus</i>	+	+	(+)
Hemoglobina humana		-	-	-
<i>Bufus marinus</i> (anfíbio)				+

a semelhança antigênica encontrada entre as hemoglobinas testadas foi menor, mostrando com isso que as reações cruzadas ocorreram apenas onde a semelhança antigênica era grande.

Analisando os resultados apresentados na tabela I, podemos observar que as hemoglobinas dos peixes das famílias Carangidae, Malacanthidae, Sciaenidae e Lutjanidae, que sempre apresentaram reações cruzadas com o soro anti-hemoglobina de *B. vetula*, se assemelham, enquanto que as hemoglobinas das famílias Orectolobidae, Gymnuridae, Rachycentridae e Chaetodontidae não são reconhecidas por esse soro, indicando dessa maneira sua estrutura antigênica diferente. Quanto às hemoglobinas dos peixes das famílias Scombridae, Serranidae, Pomadasyidae e Coryphaenidae, podemos observar que quando testadas com o soro de alta especificidade, os resultados mostraram-se negativos. Porém o resultado foi positivo quando se utilizou o soro de baixa especificidade. Esses dados, observados em hemoglobinas de diferentes famílias de mesma ordem, podem ser vistos em relação àquelas de animais classificados em outras ordens, isto é, o reconhecimento antigênico do soro em estudo é feito tanto na ordem Perciformes como Tetradontiformes.

É interessante observar que a semelhança antigênica das hemoglobinas entre peixes de diferentes ordens é também observada entre estas e as de anfíbios, o que indica que, mesmo com a grande distância filogenética, a evolução dessa molécula permitiu, em alguns casos, a manutenção de sua estrutura antigênica.

Por outro lado, apesar da existência de múltiplas formas dessa proteína nos hemolisados de eritrócitos de peixes (Duarte *et al.*, 1982), os hemolisados das espécies *E. alletteratus*, *H. plumieri*, *C. hippurus*, *S. crumenophthalmus*, *S. cavalla* e *S. brasiliensis* não possuem nenhum componente hemoglobínico bastante semelhante à hemoglobina de *B. vetula* capaz de reagir com o soro altamente específico, e as hemoglobinas

das espécies *G. cirratum*, *G. micrura*, *C. faber* e *R. canadus* não apresentam reação nem mesmo com o soro de baixa especificidade.

Quanto à possível correlação que se pode fazer entre a estrutura da molécula com suas propriedades funcionais, podemos observar que a existência de grande efeito Bohr, observada tanto em hemoglobinas de *G. cirratum* como de *E. alletteratus* (Silveira *et al.*, 1983), não é discriminada na reação de imunodifusão, o mesmo acontecendo com a afinidade pelo oxigênio, pois hemoglobinas de *G. cirratum* e *C. hippos* possuem grande afinidade (Vieira *et al.*, 1983) e também não são discriminadas nessas reações Ag — Ac.

A estrutura antigênica, conforme mostram nossos resultados, permite caracterizar a evolução da molécula ao longo de sua escala evolutiva e pode, talvez, ser correlacionada com outras propriedades estruturais da molécula, como sua compactação, sua reatividade com outros ligantes, que deverão ser, ainda, objeto de nossos estudos.

SUMMARY

English title: Structural properties of hemoglobins of marine fishes. I — Antigenic characterization.

In this paper antigenic structures of the hemolytic solutions of erythrocytes of marine fishes have been studied, using as hyper-immune serum the antihemoglobin serum of *Balistes vetula* obtained from sheep.

The used serums were obtained at different times after starting the inoculation, allowing this serum to be got at various specificity levels.

Through tests of double bidimensional immunodiffusion, the likely crossed reactions between those serums and the hemolytic solutions of erythrocytes of marine fishes have been observed, showing that with a highly specific serum only the hemolytic solutions of five species have been found to be

able to react; with a low specific serum, only five out of those hemolytic solutions did not react.

The reactions with the low specific serum have allowed crossed reactions to be observed even with hemoglobins of amphibians, showing the slow evolution of the molecule along the evolutive process.

The outcome of those tests has been discussed in respect to probable correlations which are bound to hold with a number of functional properties of the molecule, and in respect to the taxonomic classification of the studied fish species.

BIBLIOGRAFIA

Askonas, B. A. & D. G. Smith — 1964 — Antigenicity of the β — chain of human haemoglobin. *Nature*, London, 201: 496-497.

Cradock-Watson, J. E. — 1967 — Immunological similarity of horse, donkey and mule hemoglobins. *Nature*, London, 215: 630-631.

Duarte, A. M. S. F.; M. S. F. S. Silveira; H. F. Vieira & M. L. C. Vieira — 1982 — Propriedades estruturais de hemoglobinas de peixes marinhos. I — Caracterização eletroforética. *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 22 (1/2): 43-49.

Higgins, P. J. & C. S. Rand — 1975 — Comparative immunology of *Galapagos iguana* hemoglobins. *J. Exp. Zool.*, London, 193: 391-397.

Ingram, V. M. — 1975 — Gene mutation in human haemoglobin: the chemical difference between normal and sick cell haemoglobin. *Nature*, London, 180: 326-328.

Jurd, R. D. & N. Maclean — 1969 — The investigation of *Xemopus laevis* hemoglobins during development by a fluorescent antibody. *Experientia*, Basel, 25: 626-628.

Lykakis, J. J. — 1974 — A phylogenetic study on turtle hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, 48 B: 231-240.

Maniatis, G. M. & V. M. Ingram — 1971 — Erythropoiesis during amphibian metamorphosis. II. Immunochemical study of larval and adult hemoglobins of *Rana catesbeiana*. *J. Cell. Biol.*, 49: 380-389.

Ouchterlony, O — 1958 — Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy*, 5: 78-82.

Portus, M. I. G.; M. L. C. Vieira; H. F. Vieira; A. R. Oliveira & A. Focesi Jr. — 1983 — Hemoglobinas em silurídeos da Amazônia Central. III — Caracterização imunológica de alguns bagres e cascudos. *Acta Amazonica*, Manaus, 13 (2).

Reichlin, M. — 1970 — The distribution of specificity in rabbit antisera directed toward human hemoglobins. *Immunochemistry*, Oxford, 7: 15-27.

Reichlin, M. 1972 — Localizing antigenic determinants in human haemoglobin with mutants: molecular correlations of immunological tolerance. *J. Mol. Biol.*, London, 64: 485-496.

Reichlin, M. — 1975 — Amino-acid substitution and the antigenicity of globular proteins. *Adv. Immun.*, New York, 20: 71-119.

Reichlin, M. & B. J. Davis — 1979a — Antigenic relationships among fishes common to the Amazon River basin. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, 62 A: 101-104.

Reichlin, M. & B. J. Davis — 1979b — A precipitating reaction between human serum and fish hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, 62 A: 105-107.

Riggs, A. — 1970 — Properties of fish hemoglobins, *In* W. S. Hoar & D. J. Randall (Eds.), *Fish Physiology*, Academic Press, New York.

Silveira, M. S. F. S.; A. M. S. F. Duarte; M. L. C. Vieira & H. F. Vieira — 1983 — Propriedades funcionais de hemoglobinas de peixes marinhos. II — Efeito Bohr. *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 23: 31-35.

Vieira, H.F.; M.S.F.S. Silveira; A. M. S. F. Duarte & M. L. C. Vieira — 1983 — Propriedades funcionais de hemoglobinas de peixes marinhos. I — Afinidade pelo oxigênio. *Arq. Ciên. Mar*, Fortaleza, 23: 25-30.

Vieira, H. F.; M. L. C. Vieira; N. C. Meireles & A. Focesi Jr. — 1982 — Some functional and structural properties of *Bufus paracnemis* and *Pipa pipae* hemoglobins. *Comp. Biochem. Physiol.*, London, 73 A: 200-203.

Vieira, M. L. C.; H. F. Vieira — 1983 — Imunogenicidade da hemoglobina de *Balistes vetula*. *Rev. Fac. Med. Univ. Fed. do Ceará*, Fortaleza, 23 (1/2): 49-53.

Vieira, M. L. C.; H. F. Vieira; N. C. Meireles & A. Focesi Jr. — 1981 — *Pipa carvalhoi* hemoglobins. VIII. Comparative serological studies with terrestrial amphibia haemoglobins. *IRCS Med. Sci.*, Lancaster, 9: 50-57.