

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 45

Dezembro, 1947

Fascículo 4

As proteínas nucleares nos seláceos (*)

por

Humberto T. Cardoso e Clotilde Pirro

A pesquisa de composição das núcleo-proteínas do esperma de peixes, a qual data de meio século, iniciando-se com o trabalho original de Miescher (6), evidenciou dois grupos de substâncias químicas cujo estudo tem progredido constantemente até os nossos dias e cujo valor na biologia tem progressivamente aumentado: os ácidos nucleicos e as proteínas conjugadas com os mesmos.

Com referência a essas proteínas conjugadas, as protaminas e histonas, foram publicados vários trabalhos, estudando, além da sua constituição e propriedades físicas e químicas, ainda a sua utilização terapêutica. Constituem até hoje, portanto, objeto de grande interesse científico.

As protaminas têm composição diferente quanto aos seus amino-ácidos básicos, variando com as espécies dos peixes de onde procedem.

As histonas ocorrem em vários animais, como é o caso da bem conhecida histona do timo da vitela, sendo encontradas, ainda, no esperma de peixes. Representam elas, do ponto de vista da complexidade da estrutura, um grupo de transição entre as proteínas propriamente ditas e as protaminas.

Nos peixes, segundo autores como MIESCHER e KOSSEL (6), representam esses compostos um estágio de transição na formação das protaminas, daí serem encontrados em testículos ainda não maduros. Entretanto, em espermas de muitos peixes, somente se conseguem isolar histonas.

Pareceu-nos interessante verificar, no caso dos cações, qual o tipo de núcleo-proteína existente ou predominante.

(*) Trabalho da Divisão de Química e Farmacologia, Seção de Química.

Trata-se de um grupo de peixes, com características bem acentuadas e tendo a vantagem de fornecerem uma quantidade grande de material, consequência do tamanho em que geralmente são encontrados.

Por outro lado, os métodos clássicos de extração das núcleo-proteínas, de MIESCHER e KOSSELL, hoje podem ser comparados com os recentemente publicados por MIRSKY (7) e BENSLEY (1), que visam uma maior purificação do material, preservando, principalmente, as suas propriedades físicas.

Nestas condições, julgamos oportuno aplicar separadamente as técnicas de KOSSELL (5) e de MIRSKY (7), no desenvolvimento deste trabalho.

Por especial deferência da Fundação Abrigo do Cristo Redentor e, particularmente, do seu Provedor Sr. Rafael Levi Miranda, foi-nos permitido colher o material na Escola Técnica Darcy Vargas, na ilha da Marambaia, Estado do Rio, aproveitando o grande desenvolvimento que tem, naquele estabelecimento de ensino, a pesca do cação industrializada.

Na zona em que operam os harcos da Escola, Baía de Sepetiba e adjacências até Angra dos Reis, são colhidos preponderantemente os peixes da família *Sphyrnidae*, Mir. Rib., dos gêneros *Carcharias*, Raf., *Galeocerdo*, Ranz., e *Odontaspis*, Shau., conforme resultado do inquerito feito anos atrás e publicado por um de nós, anteriormente (2).

Para este trabalho, utilizamos o material proveniente dos gêneros *Carcharias* e *Galeocerdo*, por serem os seus peixes de maior porte e os mais frequentemente capturados.

Mostraram os resultados obtidos não haver diferença, praticamente evidenciável, entre as proteínas nucleares procedentes dos peixes desses dois gêneros.

Em conjunto, as proteínas isoladas apresentaram-se com propriedades que se assemelharam às das histonas, independentemente do método de extração utilizado.

Parte experimental:

I — Colheita do material: O cação pescado na Escola Técnica Darcy Vargas é, via de regra, de tamanho grande, o que facilita a retirada direta do esperma.

Por força da técnica empregada para o preparo do óleo de cação, os peixes devem ser eviscerados no próprio barco de pesca, e os fígados são retirados imediatamente, a fim de preservá-los da decomposição.

Por uma via de acesso abdominal são retiradas as vísceras. Os testículos se acham dispostos, longitudinalmente, na parte mais dorsal da cavidade abdominal.

A colheita do esperma é feita diretamente, tendo este o aspecto de uma massa viscosa, branco-amarelada, existindo em quantidade variável. Procurou-se colher o material somente em animais sexualmente maduros, para garantir a existência, apenas, da proteína conjugada típica do peixe.

O material assim obtido era passado através de pano de tecido fino, a fim de eliminar fragmentos de material estranho.

II — Extração da proteína: 1.º método: Procedemos do modo indicado pela técnica de MIRSKY e POLLISTER (7), na fase inicial, tratando o esperma com solução 2M de NaCl.

Depois de feita a extração, com agitação, por algum tempo, procedemos, então, à separação, em super-centrifuga Sharples, dos corpos dos espermatozoides da solução salina extratora. Esta operação é demorada e, por vezes, incompleta, dada a excessiva viscosidade do líquido. Neste último caso, recorreremos a uma filtração com pressão, a fim de completar a separação.

Obtida a solução da proteína, desviamos-nos um pouco da técnica de MIRSKY, fazendo a separação da mesma pela adição de álcool, na proporção de 3 volumes para 1 da solução inicial, seguindo-se uma decantação do precipitado, que é abundante. Finalmente, filtrámos ou centrifugamos o material.

2.º método: Neste, seguimos a técnica indicada por KOSSELL (5), fazendo o tratamento do esperma com ácido acético, e desidratando-o com álcool seguido de éter.

III — Decomposição da núcleo-proteína: O material obtido por qualquer dos métodos precedentes, de acordo com a técnica de KOSSELL (5) foi tratado por ácido sulfúrico a 1%, em extrações sucessivas à temperatura ambiente, com agitação permanente, separando-se, de cada vez, por meio de centrifugação, o extrato do sólido residual. A solução final foi, então, filtrada, para assegurar a ausência de material insolúvel e o sulfato da proteína foi precipitado pela adição de álcool.

IV — Purificação do sulfato da proteína nuclear: Procedeu-se, ainda aqui, de acordo com a técnica de KOSSELL, dissolvendo o material em água e reprecipitando com álcool, repetidas vezes e, por fim, transformando-o em picrato, cristalizando e liberando o ácido pícrico com ácido sulfúrico.

Este método aplicou-se tanto ao material proveniente da extração com cloreto de sódio como ao resultante do tratamento com ácido acético.

V — Reações gerais: O produto obtido apresentou-se sob o aspecto de um pó branco, solúvel em água com relativa facilidade, dando soluções ligeiramente opalescentes.

Empregando-se este material, obtiveram-se os resultados apresentados no quadro (I) para as diferentes reações gerais.

QUADRO I

REAÇÕES GERAIS DAS PROTEÍNAS COM O MATERIAL OBTIDO PELOS DOIS MÉTODOS

REAÇÕES CARACTERÍSTICAS	EXTRAÇÃO SEG. KOSSEL	EXTRAÇÃO SEG. MIRSKY
Sakaguchi.....	fortemente positiva..	positiva
Birueto.....	positiva.....	francamente positiva
Ehrlich-diazo.....	vermelho forte.....	vermelho forte
Ehrlich-p. aminodimet.....	violeta, verde.....	violeta forte, azul
Histidina.....	negativa.....	amarelo muito fraco
Millon.....	positiva.....	fortemente positiva
Hopkins-Cole.....	anel púrpura fraco..	anel purpura
Tirosina.....	positiva.....	positiva
Triptofana.....	positiva.....	positiva

VI — Curvas de titulação: Seguimos a técnica indicada por KEKWICK e CANNAN (4), com a diferença, apenas, de utilizar electródio de vidro em substituição ao de hidrogênio, empregado por êsses autores.

Afim de comparar os resultados obtidos com o dos autores antes citados, fizemos paralelamente uma curva com a albumina de ovo, preparada e purificada segundo as indicações contidas nos artigos citados.

Os volumes das amostras de albumina e da proteína nuclear foram de 3 ml. Empregando micro-buretas, de volume total de 5 ml., adicionaram-se a cada amostra da proteína, na ocasião devida, o ácido clorídrico e o hidróxido de sódio, ambos de concentração 0.1N, sendo os volumes completados a 10 ml, para facilidade do cálculo final.

As determinações da concentração iônica do hidrogênio, feitas pelo potenciômetro de LEEDS e NORTHRUP, modelo 7663-A1, dotado de electródio de vidro, foram realizadas em seguida à adição do ácido ou da base e ao ajuste do volume final, evitando-se qualquer demora excessiva. Assim, o tempo foi aproximadamente constante para todas as determinações. A temperatura foi mantida a 25°C.

A concentração inicial da albumina de ovo empregada sendo de 0,07gr/ml, aos 3l ml da tomada correspondem 0,21gr. A concentração final foi, portanto, de 2,1gr%, desde que todos os volumes foram completados a 10 ml. Para a proteína nuclear, de concentração inicial 0,293gr/ml, a final foi de 0,879gr%.

Para os cálculos empregamos a seguinte fórmula:

$$\text{pH} = -\log [\text{H}^+] - \log \gamma_{\text{H}^+} = \log [\text{OH}^-] + \log \gamma_{\text{OH}^-} - \log K_{\text{H}_2\text{O}}$$

Os coeficientes de atividade do H^+ e da OH^- , segundo as sugestões do trabalho de KEKWICK e CANNAN, foram tirados, respectivamente das publicações de SCATCHARD (8) e HARNED (3).

Damos, no quadro II os valores das atividades que usamos nos cálculos, alguns obtidos por inter e extrapolação, de acôrdo com as molaridades de cada amostra.

No quadro II, apresentamos os valores que encontramos para a albumina de ovo, cuja representação aparece no gráfico I.

Para a proteína nuclear, os valores determinados são apresentados no quadro IV e no gráfico II.

QUADRO II

COEFICIENTES DE ATIVIDADE DOS IONIOS H^+ E OH^- USADOS NO CÁLCULO

MOLARIDADES	COEFICIENTE ATIVIDADE H^+	COEFICIENTE ATIVIDADE OH^-
0,002.....	0,954	0,972
0,004.....	0,940	0,959
0,006.....	0,927	0,943
0,008.....	0,916	0,933
0,01.....	0,910	0,920
0,016.....	0,892	0,896
0,02.....	0,881	0,880
0,024.....	—	0,864
0,04.....	0,851	—
0,06.....	0,829	—

QUADRO III
VALORES ACHADOS PARA ALBUMINA

Nº. DA AMOSTRA	EQUIV. OH ⁻ ADICIONADOS	EQUIV. H ⁺ ADICIONADOS	ml DÁGUA	pH	h/g:10 ⁻⁴	h-h/g:10 ⁻⁴
1	---	5,61	1,39	1,65	13,70	11,54
2	---	3,74	3,26	1,9	10,55	8,39
3	---	1,87	5,13	2,8	7,89	5,73
4	---	0,56	6,44	4,75	2,6	0,44
5	---	0,19	6,81	5,5	0,87	-1,29
6	0,19	---	6,81	7,0	-0,86	-3,02
7	0,37	---	6,63	8,3	-1,75	-3,91
8	0,56	---	6,44	9,8	-2,59	-4,75
9	0,75	---	6,25	10,0	-3,44	-5,60
10	0,93	---	6,07	10,3	-4,26	-6,42
11	1,87	---	5,13	11,2	-7,88	-10,04

QUADRO IV
VALORES ACHADOS PARA A PROTEINA NUCLEAR

Nº. DA AMOSTRA	EQUIV. OH ⁻ ADICIONADOS	EQUIV. H ⁺ ADICIONADOS	ml DÁGUA	pH	h/g:10 ⁻⁴
1		1,49	5,51	2,8	14,67
2		1,12	5,88	2,8	10,78
3		0,75	6,25	3,1	7,52
4		0,37	6,63	3,5	3,87
5	0,37	---	6,63	7,2	4,25
6	0,75		6,25	10,1	8,35
7	1,12		5,88	10,7	12,12
8	1,49		5,51	11,0	15,75
9	1,87		5,13	11,25	18,95
10	2,24		4,76	11,3	22,89

SUMÁRIO

São estudadas as reações químicas e fisico-químicas de uma proteína extraída do esperma de peixes dos gêneros *Carcharias*, Raf. e *Galeocerdo*, Ranz.

Parece tratar-se de histonas, tendo em vista os resultados obtidos.

Queremos agradecer ao nosso companheiro e amigo Dr. Gilberto de Freitas a valiosa crítica que fez no decorrer do trabalho bem como pelas sugestões apresentadas.

BIBLIOGRAFIA

1. BENSLEY, R. R.
1942. *Science*, 96, 389.
2. CARDOSO, H. T.
1943. Estudos sobre óleos de fígado de cação-Desmobrânquios da família Sphyrnidae, Mir. Rib., gêneros *Carcharias*, Raf., *Galeocerdo*, Ranz. e *Odontaspis*, Shau., Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, tomo 39, fasc. 3.
3. HARNED, H. S.
1925. The activity coefficient of sodium hydroxide aqueous solutions. *J. Am. Chem. Soc.* 47, 676.
4. KEKWICK, R. A. e CANNAN, R. K.
1936. The hydrogen ion dissociation curve of the crystalline albumin of the hen's egg. *Biochem. J.* 30, 227.
5. KOSSELL, A.
Veja Miescher (6).
6. MIESCHER, F.
1928. in "The Protamines and Histones". Monographs on Biochemistry, by the late A. Kossell-transl. by W. V. Thorpe-Longmans, Green and Co. Ltd.
7. MIRSKY, E. A. e POLLISTER, A. W.
1942. Nucleoproteins of cell nuclei. *Proc. Nat. Acad. Sciences*, 28, 344-352.
8. SCATCHARD, G.
1925. The activities of strong electrolytes. *J. Am. Chem. Soc.* 47, 641.

GRÁFICO I

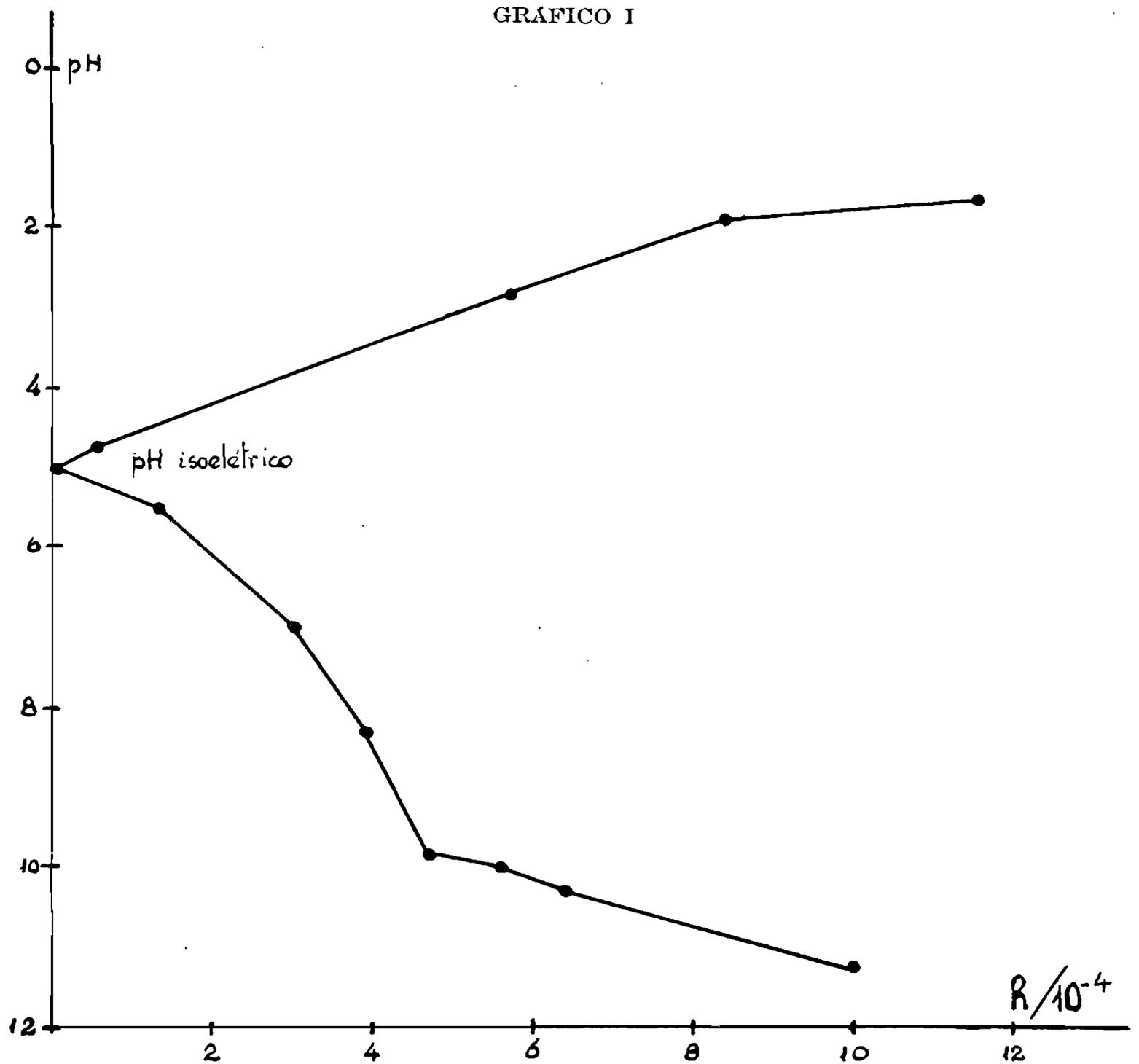
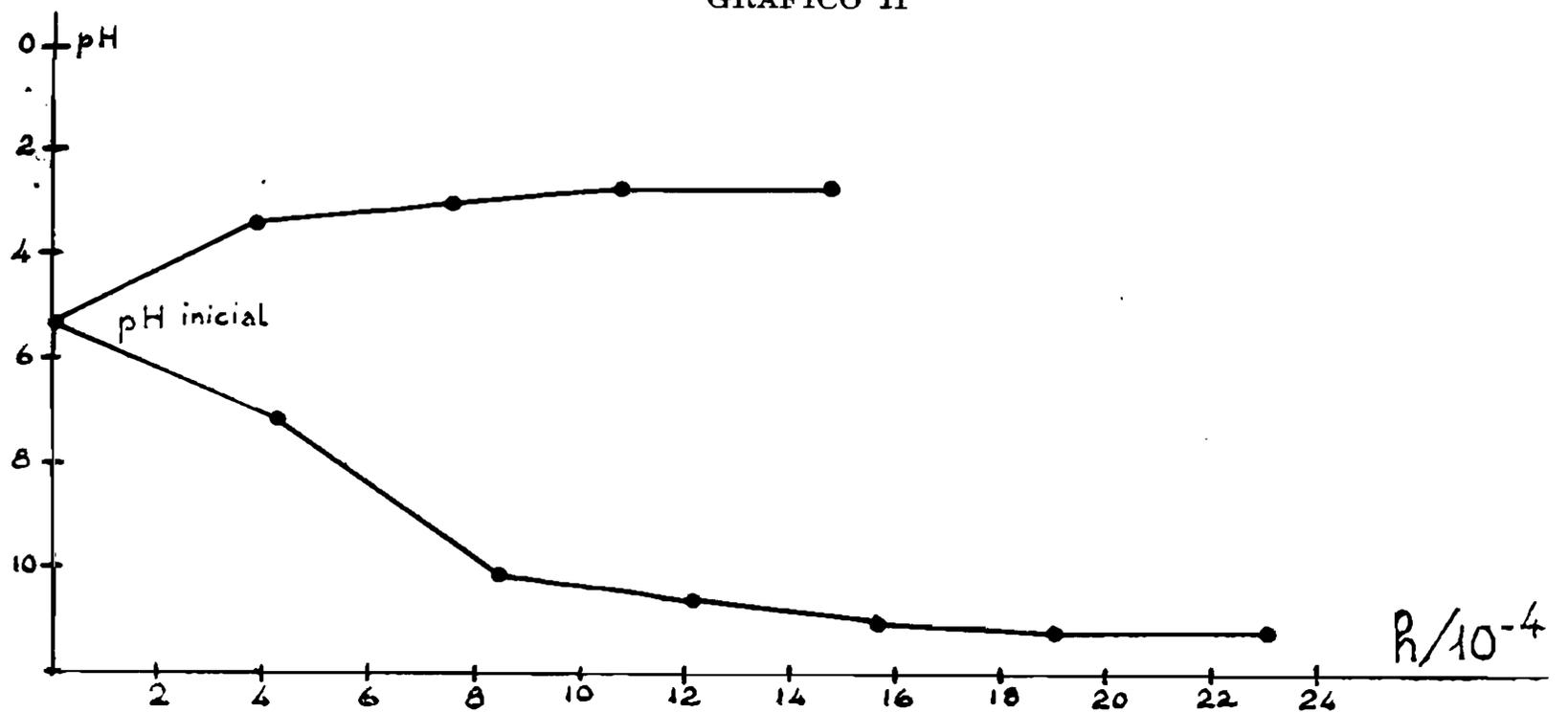
Curva de absorção de íons H^+ e H^- pela albumina de ovo

GRÁFICO II

Curva de absorção de íons H^+ e OH^- pela proteína nuclear.