

HEMOGLOBINAS EM SILURIFORMES DA AMAZÔNIA CENTRAL.

III CARACTERIZAÇÃO IMUNOLÓGICA DE ALGUNS BAGRES E CASCUDOS.

Maria Isabel G. Portus (*)

Maria Laise C. Vieira (**)

A. R. Oliveira (***)

A. Focesi Jr. (***)

Resumo

Hemoglobinas de peixes Siluriformes pertencentes às famílias **Doradidae**; **Auchenipteridae**; **Pimelodidae**; **Angeneiosidae**; **Loricariidae** e **Callichthyidae** foram testadas contra anti-soros preparados para hemoglobina de **Oxydoras niger** (Doradidae: cuiú-cuiú) e **Plecostomus plecostomus** (Loricariidae: cascudo pedra). As reações serológicas de dupla difusão em ágar mostraram que o anti-soro para **O. niger** reagiu com hemoglobinas de todas as espécies de bagres e cascudos testadas, com exceção de **P. plecostomus** (cascudo pedra) e da fração I da hemoglobina de **P. pardalis** (cascudo comum). Por outro lado, o anti-soro para **P. plecostomus** (cascudo pedra) reagiu apenas com o antígeno homólogo; com a fração I de hemoglobina de **P. pardalis** (cascudo comum) e com hemoglobina humana.

INTRODUÇÃO

Várias espécies de peixes contêm em seus hemolisados hemoglobinas que diferem ponderavelmente entre si. Assim um mesmo hemolisado pode conter duas ou mais he-

moglobinas com propriedades funcionais completamente diferentes. Estudos detalhados funcionais e estruturais em truta **Salmo gairdneri** (Brunori et al., 1974); **Hoplosternum littorale** (Garlick, et al., 1978); **Pterygoplichthys pardalis** (Brunori et al., 1978); **Mylossoma** sp., pacú (Martin et al., 1978) demonstraram estas afirmativas.

Dentro dos Silurídeos tem-se observado que os peixes que sobrevivem em meios os mais drásticos, de extrema hipoxia e acidez como o são os das famílias dos Loricariidae e Callichthyidae apresentam de modo geral maior heterogeneidade eletroforética, componentes catódicos e anódicos, além de funcionalmente apresentarem diferenças qualitativas profundas. Tais diferenças funcionais são determinadas evidentemente por diferenças estruturais entre as hemoglobinas; e entre os métodos mais sensíveis utilizados nas determinações de diferenças estruturais em proteínas são aqueles imu-

(*) Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM.

(**) Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

(***) Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

nológicos, já que a antigenicidade de uma proteína reflete primariamente sua superfície (Reichlin, 1975).

Com objetivo de avaliarmos se hemoglobinas funcionalmente diversas possuem moléculas estruturalmente muito diferentes entre os Siluriformes, procuramos induzir anticorpos em coelhos com hemoglobina de uma espécie de bagre (*Oxydoras niger*) e de uma espécie de cascudo (*Plecostomus plecostomus*), e através de reações cruzadas de imunodifusão avaliamos a identidade entre as diferentes hemoglobinas de várias espécies.

MATERIAIS E MÉTODOS

As Hemoglobinas de peixes da família Doradidae (3 exemplares), Auchenipteridae (2), Pimelodidae (4), Angeneiosidae (1), Loricariidae (5) e Callichthyidae (6) coletadas no Lago Janauacá, Rio Solimões, foram utilizadas para as reações de dupla difusão e foram obtidas sangrando peixes adultos por punção cardíaca com seringa heparinizada. As hemácias foram separadas e lavadas com NaCl 1,7%, tris 1 mM pH 8,0 a 4°C e após, lisadas com tris 1 mM pH 8,0, obtendo-se após centrifugação soluções de hemoglobinas que foram utilizadas como antígenos nas reações de imunodifusão.

Foram utilizadas nas reações imunológicas os anti-soros das hemoglobinas de cuiú-cuiú (*O. niger*) e cascudo pedra (*P. plecostomus*), que apresentaram um único compo-

nente de hemoglobina por eletroforese em gel de poliácridamida 7,5% pH 8,9 segundo técnica descrita por Ornstein, 1964 e Davis, 1964. Os anti-soros foram preparados mediante injeções intramusculares semanais e individuais, de 3 ml de uma emulsão de hemoglobina (20 mg/ml) em adjuvante de Freund (v/v) aplicadas em coelhos adultos 2 a 3 kg de peso, completando-se um ciclo de injeções após 45-60 dias. Nestas condições obtiveram-se anti-soros de título 1:32 nos coelhos injetados com as respectivas hemoglobinas.

As reações de imunodifusão foram analisadas em lâminas de vidro de 7,5x2,5 cm, cobertas com 2 a 3 mm de ágar-ágar 1,5% em tampão fosfato 0,01 M pH 7,0. O anti-soro foi utilizado sem diluição num orifício central e após 2 horas as diferentes soluções de hemoglobinas dos peixes foram colocadas em orifícios externos. As soluções eram previamente diluídas em solução salina até concentração aproximada de 1 mg/ml. As linhas de precipitação formadas a temperatura ambiente eram analisadas após 24 e 36 horas, a reação era completada nas primeiras 24 horas, esporadicamente colorações com amido Black 5% eram realizadas para melhor visualização das linhas de precipitação.

RESULTADOS

As hemoglobinas dos peixes Silurídeos foram caracterizadas imunologicamente por reações cruzadas

de imunodifusão contra o anti-soro de hemoglobina de *Oxydoras niger*, cuiú-cuiú, e de *Plecostomus plecostomus*, cascudo pedra. O exame da Tabela I mostra que nas espécies das famílias Doradidae, Auchenipteridae, Pimelodidae e Angeneiosidae (bagres), todas as hemoglobinas apresentam reação de identidade contra o anti-soro de hemoglobina de cuiú-cuiú e nenhuma reação contra o anti-soro de cascudo pedra. Nas famílias Loricariidae e Callicthyidae (cascudos) observamos dois tipos de reação imunológica: as hemoglobinas das espécies de *Ancistrus* sp., *Hemiancistrus scaphirhynchus*, *Loricariichthys typus*, *Pterygoplichthys pardalis*, *Pterygoplichthys* sp e *Hoplosternum thoracatum* (macho e fêmea) apresentam reações de identidade contra o anti-soro de cuiú-cuiú e nenhuma contra o anti-soro de cascudo pedra; e observou-se uma reação oposta nas hemoglobinas de *Plecostomus plecostomus*, cascudo pedra, e o componente catódico de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, não apresentaram reação cruzada de imunodifusão contra o anti-soro de hemoglobina de cuiú-cuiú, contudo mostram nítida identidade contra o anti-soro de cascudo pedra. Reação imunológica idêntica foi observada quando se utilizou estes dois tipos de anti-soros contra a hemoglobina humana, isto é, esta proteína só reage contra o anti-soro de cascudo pedra.

DISCUSSÃO

A caracterização de hemoglobinas de peixes mediante reações imunológicas tem trazido importantes contribuições para o esclarecimento do binômio estrutura-função nestas proteínas de peixes. Reichlin & Davis, 1979, por exemplo, demonstraram diferenças imunológicas nítidas entre as hemoglobinas de Silurídeos de respiração aérea e aqueles de respiração branquial: as hemoglobinas dos peixes de respiração aérea precipitam com soro anti-truta I, enquanto que nenhuma reação entre as hemoglobinas de Silurídeos de respiração branquial pode ser constatado. Baseados nestes achados imaginamos poder identificar imunologicamente as hemoglobinas dos peixes Siluriformes mediante a preparação de anti-soro de hemoglobina de *Oxydoras niger*, cuiú-cuiú, peixe comumente denominado bagre com características morfológicas próprias, que apresenta um único componente de hemoglobina na análise eletroforética em gel de poli-acrilamida, e um anti-soro de hemoglobina de cascudo, *Plecostomus plecostomus*, cascudo-pedra, também com um único componente de hemoglobina. Nossos resultados mostram que as hemoglobinas de todos os bagres e cascudos analisadas apresentam pelo menos um componente em comum, uma vez que as reações cruzadas de imunodifusão para os peixes foram sempre positivas contra anti-soro de hemoglobina de cuiú-cuiú. Entre os

TABELA 1 — Reações imunológicas cruzadas entre anti soros de cuiú-cuiú e cascudo-pedra com hemoglobinas de diferentes bagres e cascudos do Rio Amazonas. A hemoglobina humana foi também ensaiada.

Famílias	Espécies	Nomes comuns	Anti soro de hemoglobina de	
			cuiú-cuiú	Cascudo-pedra
Doradidae	<i>Anadoras regani</i>	rabeca	+	—
	<i>Oxydoras niger</i>	cuiú-cuiú	+	—
	<i>Pterodoras granulosus</i>	bacú	+	—
Auchenipteridae	<i>Auchenipterus</i> sp.	mandí-peruano	+	—
	<i>Trachycorystes</i> sp.	cangati	+	—
Pimelodidae	<i>Brachyplatystoma</i> sp.	páraiba	+	—
	<i>Pimelodus blochii</i>	mandí comum	+	—
	<i>Pinirampus pirinampu</i>	piranambu	+	—
	<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	surubim	+	—
	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	caparari	+	—
Angeneiosidae	<i>Angeneiosus brevifilis</i>	mamdubé	+	—
Loricariidae	<i>Ancistrus</i> sp.	cascudinho 1	+	—
	<i>Hemiancistrus scaphirhynchus</i>	cascudinho 2	+	—
	<i>Loricariichthys typus</i>	cachimbo 2	+	—
	<i>Plecostomus plecostomus</i>	cascudo pedra	—	+
	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>	cascudo comum	+	—
	Fração I de Hb	cascudo comum	—	+
Callinichthyidae	<i>Pterygoplichthys</i> sp	cascudo jacaré	+	—
	<i>Hoplosternum thoracatum</i> (fêmea)	tamoatá 2	+	—
	<i>Hoplosternum thoracatum</i> (macho)	tamoatá 2	+	—
	Hemoglobina humana		—	+

casquados contudo observamos, pelo menos, uma hemoglobina diferente que poderia estar de alguma forma relacionada à respiração adicional que se apresenta neste grupo de peixes ou então refletir certa relação genealógica entre as famílias.

Outra conclusão a que chegamos pela análise dos resultados é a alta especificidade do soro anti-casquado-pedra que só reage com o antígeno homólogo e um dos componentes de *P. pardalis*. Se considerarmos que o título encontrado para estes soros está em concentração suficientemente alta, nossos resultados podem revelar-se interessantes para o estudo mais aprofundado desta alta especificidade.

Outro fato que nos parece de alto interesse é que hemoglobina humana reage com anticorpo de casquado-pedra e não com o de cuiú-cuiú; o significado de tal reação poderia servir como evidência das estruturas existentes na superfície da hemoglobina de casquado, semelhantes à da hemoglobina humana, e parece tratar-se de interessante modelo de interação proteína-proteína.

SUMMARY

Specific antisera to *Oxydoras niger* (Doradidae: cuiú-cuiú) and *Plecostomus plecostomus* (Loricariidae: casquado-pedra) hemoglobin were tested against fish hemoglobin of Doradidae; Auchenipteridae; Pimelodidae; Angeneiosidae; Loricariidae and Callichthyidae.

Serological double diffusion tests in agar have shown that *O. niger* antise-

rum gives positive reaction against hemoglobin of all the species of "bagres" and "casquados" tested with only two exceptions *P. plecostomus* (casquado-pedra) and *P. pardalis* (casquado comum) fraction I hemoglobin which gave negative reactions.

On the other hand, the *P. plecostomus* antiserum gave positive reaction only for the homologous and *P. pardalis* fraction I antigens.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRUNORI, M.; GIARDINA, B.; ANTONINI, E.; BENEDETTI, P. A.; BIANCHINI G.

1974 — Distribution of haemoglobin components of trout blood among the erythrocytes: observations by single cell spectroscopy. *J. Mol. Biol.*, 86, 165–169.

BRUNORI, M.; BONAVENTURA, J.; FOCESI, Jr. A.; GALDAMES PORTUS, M. I.; WILSON, M. T.

1978 — Separação e caracterização dos componentes de hemoglobina de *Pterygoplichthys pardalis*, o acari-bodó. *Acta Amazônica*, 8(4) 231–238.

DAVIS, B. J.

1964 — Disc electrophoresis. II. Method and applications to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121: 404–427.

GARLICK, R. L.; BUNN, H. F.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E. H.; MARLIN, J. P.; NOBLE, R. W.; POWERS, D.A.

1978 — Estudos funcionais dos componentes separados de hemoglobina de um bagre de respiração aérea, *Hoplosternum littorale* (Hancock). *Acta Amazônica*, 8 (4) 293–304.

MARTIN, J. P.; BONAVENTURA, J.; BRUNORI, M.; FYHN, H. J.; FYHN, U. E.H.; GARLICK, R. L.; POWERS, D.A.; WILSON, M. T.

1978 — Isolamento e caracterização dos componentes de hemoglobina de *Mylossoma sp.*, um teleósteo da Amazônia. *Acta Amazônica*, 8 (4) 205-215.

ORNSTEIN, L.

1964 — Disc electrophoresis. I. Back ground and theory. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 121 321-349.

REICHLIN, M.

1975 — Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins. *Adv. in Immunology*, 20, 71-119.

REICHLIN, M. & DAVIS, B. J.

1979 — Relações antigênicas entre peixes comuns à bacia do Rio Amazonas. *Acta Amazônica*, 8 (4) 133-138.

(Aceito para publicação em 10/11/81)