

Relações antigênicas entre peixes comuns à bacia do rio Amazonas (*)

Morris Reichlin (1)
Bonnie J. Davis (2)

Resumo

Utilizando antissoro para hemoglobinas de carpa e truta, as hemoglobinas de peixes comuns do rio Amazonas exibiram vastas reações cruzadas. Enquanto nenhuma hemoglobina de peixe precipitou com antissoro de truta 4 (componente anódico), muitas hemoglobinas participaram tanto com antissoro de truta 1 (componente catódico) ou com hemoglobina de carpa. Vários padrões de reatividade podem ser descritos entre as hemoglobinas polidispersas de várias espécies que foram analisadas por separação eletroforética dos componentes e uma determinação da habilidade de reagir dos componentes individuais com os dois tipos de antissoro. O mais notável foi a diferente reatividade notada entre os Siluriformes "catfish" onde as hemoglobinas dos "catfishes" de respiração aérea reagiram mais fortemente com o soro antitruta 1 do que com soro anticarpa enquanto as hemoglobinas de "catfish" respiração branquial se comportaram de modo recíproco.

INTRODUÇÃO

Entre as espécies de vertebrados, os peixes exibem um alto (se não o mais alto) grau de diversidade estrutural e funcional nas suas hemoglobinas. Entendendo esta diversidade molecular pode ser abordada por uma variedade de instrumentos analíticos. Métodos imunológicos estão em primeiro lugar na facilidade com que as relações qualitativas entre as seqüências de amino-ácidos podem ser avaliada. Esta comunicação descreve os resultados de um levantamento imunológico qualitativo das Hbs de peixes comuns à bacia do rio Amazonas, próximo a Manaus, Brasil. O antissoro de coelho usado foi preparado contra Hbs de truta 1 e 4 e carpa. Embora nenhum desses peixes viva na bacia do rio Amazonas, estes antissoros provaram sua utilidade no reconhecimento das relações de Ordem e Família e permitiram

um critério inicial dos tipos e distribuição das cadeias polipeptídicas contidas nas hemoglobinas dos peixes do rio Amazonas. Algumas correlações notáveis foram feitas também entre propriedades antigênicas e propriedades fisiológicas das Hbs dos peixes estudados.

MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARAÇÃO DO ANTISSORO

O antissoro foi preparado em coelhos para Hbs 1 e 4 de truta por uma dose e esquema descrito recentemente (Tan-Wilson *et. al.*, 1976). O antissoro de coelho para um dos tipos eletroforéticos lentos de Hb de carpa foi preparado de maneira similar.

PROPRIEDADES DO ANTISSORO

As propriedades imunológicas quantitativas do soro antitruta utilizado foram descritas (Tan-Wilson *et. al.*, 1976). Os resultados daquele estudo foram compatíveis com o fato de que Hbs 1 e 4 de truta não compartilhava cadeias idênticas de polipeptídeos e, além disso, que as duas Hbs eram imensamente diferentes tanto em suas cadeias α como β . Nos métodos qualitativos usados neste estudo (difusão em agar descrita abaixo), estes soros comportaram-se como reagentes quase específicos; i.e. Hb 1 de truta não precipitam com anti Hb 4 e Hb 4 de truta precipitava apenas fracamente com antitruta Hb 1. Anticorpos para Hb de carpa não precipitaram nem com truta Hb 4 nem com truta Hb 1; nem Hb carpa precipitou com antissoro para truta Hb 1 e 4. Assim, cada soro era um reagente que poderia ser usado para identificar determinantes antigênicos relacionados à Hb de truta 1,4 e hemo-

(*) — Versão original inglesa publicada em *Comp. Biochem. Physiol.* vol. 62A(1). 1979.

(1) — Department of Medicine, State University of New York at Buffalo, Buffalo N.Y. 14215.

(2) — Department of Biology, San Francisco State University, San Francisco, California 94132.

globina de carpa entre as hemoglobinas de muitas espécies de peixe estudados na IV expedição ao Amazonas. A natureza altamente específica destes antissoros está refletida por resultados que mostram a larga e independente distribuição de estruturas antigênicas em hemoglobina de peixe reativas com Hbs antitruta e carpa.

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Os peixes usados neste estudo foram coletados no rio Solimões e no rio Negro, próximo a Manaus, Brasil. Os peixes eram sangrados por punção cardíaca e o sangue coletado em solução salina (1,7% NaCl) fria, heparinizada. As células vermelhas eram separadas no plasma por centrifugação a 5.000 g por 5 minutos numa centrífuga refrigerada Sorvall. Após 3 lavagens com salina fria, as células eram lisadas com tampão Tris frio, diluído (0,001M), pH 8,0. A lise era realizada por 1 hora, então se adicionava NaCl para uma concentração final de 0,1M, e o lisado centrifugado a 17.000 g por 20 minutos para remover partículas celulares. O sobrenadante limpo, vermelho, foi cuidadosamente transferido para um frasco limpo e guardado no refrigerador para uso posterior.

ELETROFORESE EM POLIACRILAMIDA

A eletroforese em *gel* de disco, usando 7 1/2% de acrilamida a pH 8,9 foram feitas segundo Davis (1964) e Ornstein (1964). A amostra de hemoglobina era reduzida para o estado ferroso pelo método descrito por Fyhn & Sullivan (1975). A hemoglobina foi adicionada ao *gel* em quantidades suficientes para que os diferentes componentes pudessem ser visualizados sem coloração. O *gel* era então cortado em volta das faixas vermelho-pálido.

DIFUSÃO EM AGAR

A dupla difusão em agar foi realizada pelo método de Ouchterlony (Reichlin, 1975). Os experimentos eram realizados em placas de Petri de plástico 60 x 15 mm (Falcon # 1007, Oxnard, California). Agarose (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wis.) *gel* (0,6%) foi dissolvido em solução de NaCl 0,9% feita com água deionizada, bidestilada. Os antissoros fo-

ram usados em depósitos feitos com um furador de cortiça de 6 mm e o antígeno em depósitos de 4 mm de diâmetro em um arranjo septagonal. O antissoro era usado sem diluição e a solução de Hb era utilizada em concentrações de 0,1 a 0,5 mg Hb/ml. Concentrações de hemoglobina maiores do que 2,0 mg/ml dissolviam muito do potencial de imuno precipitação mas a precipitação era reproduzível aos níveis mais baixos empregados. A precipitação era realizada à temperatura ambiente que no "Alpha Helix" variava entre 30-33°C. As placas eram lidas com 6, 12 e 24 horas. A estas temperaturas a precipitação estava invariavelmente completa com 12 horas.

EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO

A absorção foi realizada pela adição de um volume do hemolisado (concentração 1-5%) que era 1/10 do volume do antissoro. Isto resultou em uma concentração de Hb final de 1 a 5 mg/ml muito além da zona de equivalência de qualquer dos sistemas envolvidos. O soro absorvido era então utilizado no centro do depósito do arranjo septagonal com uma lista de hemoglobinas representativas de 26 espécies de peixes.

RESULTADOS

A primeira aproximação à análise antigênica das hemoglobinas de peixe era simplesmente testar suas reatividades em experimentos de difusão em *gel* com os 3 antissoros disponíveis: o antitruta Hb 1, antitruta Hb 4 e anticarpa Hb. De todas as amostras de hemoglobina testadas, nenhuma precipitou com os antissoros para truta Hb 4. A significação desta dramática descoberta será determinada na discussão. Notou-se que um número significativo de hemoglobinas de peixe não precipitavam com nenhum antissoro. O mais notável entre estes foi afastado relacionamento dos elasmobrânquios (Potamotrygonidae) e sarcopterygians (Lepidosirenidae). Não surpreendentemente, Hb de *caecilians* adultas e fetais (*Typhlonectes compressicauda*) não precipitaram com nenhum antissoro. Dos Osteoglossidae, a Hb de *Arapaima gigas* precipitou apenas com soro anticarpa Hb. Como pode ser visto na Tabela 1, todos os peixes caracídeos e gym-

TABELA 1

Família	Espécies	à	à
		Trout	Carp
		1	
Potamotrygonidae	<i>Potamotrygon</i> sp.	0	0
Lepidosirenidae	<i>Lepidosiren paradoxa</i>	0	0
Osteoglossidae	<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	0	0
	<i>Arapaima gigas</i>		
Characidae	<i>Triportheus</i> sp.		
	<i>Mylossoma</i> sp.		
Curimatidae	<i>Curimatus</i> sp.	+	+
Erythrinidae	<i>Hoplias malabaricus</i>	+	+
	<i>Hoplerythrinus unitaeniatus</i>	+	+
Prochilodontidae	<i>Prochilodus</i> sp.	+	+
Cynodontidae	<i>Rhaphiodon</i> sp.	+	+
Hemiodontidae	<i>Hemiodus</i> sp.	+	+
Gymnotidae	<i>Gymnotus carapo</i>	+	+
Electrophoridae	<i>Electrophorus electricus</i>	+	+
	<i>Rhamphichthys</i> sp.	+	+
Rhamphichthyidae	<i>Pseudo doras</i>	0	0
Doradidae	<i>Brachyplatystoma</i> sp.	0	0
	<i>Pimelodus</i> sp.	0	0
Pimelodidae	<i>Auchenipterus</i> sp.	0	0
Auchenipteridae	<i>Ageneiosus</i> sp.	0	0
Ageneiosidae	<i>Hypophthalmus</i> sp.	0	0
Hypophthalmidae	<i>Hoplosternum littorale</i>	+	tr
Callichthyidae	<i>Ancistrus</i> sp.	+	+
	<i>Loricaria</i> sp.	0	0
	<i>Hypostomus</i> sp.	+	tr
	<i>Pterygoplichthys</i> sp.	+	tr
Belonidae	<i>Potamorhaphis</i> sp.	+	+
Synbranchidae	<i>Synbranchus marmoratus</i>	0	0
	<i>Chaetobranchus orbicularis</i>	+	tr
Cichlidae	<i>Cichlosoma severum</i>	+	tr
Tetraodontidae	<i>Colomesus psittacus</i>	0	0

notideos precipitaram com ambos os antissoros. Entre os "catfishes", muitas espécies de 6 famílias (Doradidae, Pimelodidae, Ageneiosidae, Auchenipteridae, Loricariidae, Hypophthalmidae) não precipitaram com nenhum antissoro. Todas estas famílias, exceto Loricariidae eram de respiração branquial e só uma espécie de *Loricaria* não precipitou com nenhum antissoro. Todas as espécies reativas de "catfishes" são de duas famílias de respi-

ração aérea (Loricariidae, Callichthyidae) e a reação de precipitação foi muito forte com soro antitruta 1 mas fraca e esporádica com soro anticarpa.

EXPERIMENTOS DE ABSORÇÃO

Para investigar a possível reatividade de hemoglobinas de peixe que deixava de precipitar em *gel* de agar também como para explorar com mais detalhes a especificidade das reações de várias Hbs, os experimentos de absorção foram compreendidos. A Tabela 2 resume os achados que demonstram várias coisas. Primeiro, há Hbs que estão mais relacionadas à Hb de carpa do que à Hb 1 de truta em suas antigenidades. O exemplo mais claro disto é Hb de *A. gigas* cuja absorção de reatividade com 18 das 19 espécies de Hb reativa com soro anticarpa enquanto atinge a reatividade de espécies só 2 das 23 amostras de Hb reativa com soro antitruta 1. A Hb de *Osteoglossum bicirrhosum* é muito similar em seus padrões de absorção e apesar de sua deficiência em precipitar com soro anticarpa, absorve com êxito — com 18 das 19 espécies reativas de Hb com soro anticarpa. Absorção com Hb de *O. bicirrhosum* não tinha nenhum efeito na precipitação de quaisquer das amostras de Hb com soro antitruta 1 como nas 23 dos 23 precipitados de Hbs após absorção. No outro extremo de especificidade, a Hb de *Ancistrus* sp. absorve totalmente a reatividade com soro antitruta 1 mas apenas cerca de metade da reatividade com soro anticarpa. Absorção com um cichlide, *Chaetobranchopsis orbicularis*, a Hb removia cerca de 2/3 da reatividade tanto com soro anticarpa como com o soro antitruta 1, enquanto a absorção com *Triportheus* sp., a Hb removia essencialmente toda a reatividade presente em ambos os soros. Finalmente, foi mostrado que várias Hbs que não conseguiam precipitar nenhum soro podiam remover uma significativa quantidade da reatividade de um dos dois antissoros usados neste estudo. Três Hbs de "catfish" de respiração branquial (*Pimelodus* sp., *Pseudodoras* sp. e *Brachyplatystoma* sp.) removeram quantidades variáveis da reatividade do soro anticarpa e exceto para *Pimelodus* sp., a Hb não tinha nenhum efeito sobre o soro antitruta 1. A Hb de *Synbranchus*

marmoratus removiu significativas quantidades da reatividade tanto do soro anticarpa quanto do soro antitrua 1.

Entre as Hbs de peixe testadas desta forma, apenas a Hb de *Lepidosiren paradoxa* não conseguiu absorver qualquer atividade dos soros anticarpa e antitrua 1.

Deveria ser mencionado que mesmo depois da absorção do antissoro com as Hbs mais ativos desta relação (*Ancistrus* sp. e *Triporthus* sp.) e reatividade muito significativa de precipitina ainda permanecia com os antígenos homologos, Hb de Truta 1 e Hb de carpa. Estes padrões de reatividade encontrados entre as Hb de peixes examinados foram obtidos utilizando-se uma fração de anticorpos neste soro.

TABELA 2

Absorvido com	Estudos de absorção Fx espécies testadas precipitando conti- nuamente	
	a Carp	a Trout 1
<i>Arapaima gigas</i>	1/19	21/23
<i>Osteoglossum bicirrhosum</i>	2/19	23/23
<i>Synbranchus marmoratus</i>	6/19	13/23
<i>Lepidosiren paradoxa</i>	19/19	23/23
<i>Triporthus</i> sp.	1/19	0/23
<i>Chaetobranchopsis orbicularis</i>	7/19	6/23
<i>Ancistrus</i> sp.	8/19	0/23
<i>Pimelodus</i> sp.	14/19	19/23
<i>Pseudo doras</i> sp.	15/19	23/23
<i>Brachyplatystoma</i> sp	12/19	23/23

ESTUDOS ELETRFORÉTICOS E CROMATOGRÁFICOS

Os componentes eletroforéticos polidispersos reagem em padrões característicos quando eram analisados antigenicamente como espécies moleculares isoladas. Esses dados estão resumidos na Tabela 3, na qual a intensidade da precipitação é graduada numa escala de 0-4+. Quatro padrões de reação foram observados. No padrão A, os componentes isolados da Hb de *Arapaima gigas* reagiram apenas com Hb de anticarpa. No padrão B que inclui todos os Characidae (*Mylossoma* sp.)

como também os Erythrinidae, os componentes anódicos reagem invariavelmente mais fortemente com Hb de anticarpa do que com Hb antitrua enquanto os componentes catódicos reagem com antitrua HbI melhor do que ou também como com o soro anti Hb de carpa. No padrão C, todos os componentes do gel reagem igualmente bem com ambos os antissoros. As Hbs de peixes que exibiram este comportamento foram de Prochilodontidae, Gymnotidae, Rhamphichthyidae e Cichlidae. O último padrão observado era o dos múltiplos componentes que reagiram quase exclusivamente com soro antitrua 1 e fracamente com soro anticarpa. Tornou-se visível com Hbs de *Ancistrus* sp., *Hoplosternum littorale* e *Hypostomus* sp. Hbs isoladas em geis de poliacrilamida que os componentes catódicos reagiram muito mais fortemente do que os anódicos com o soro antitrua 1.

TABELA 3 — Reações representativas de precipitina de componentes eletroforéticos e isolados de Hb de peixe.

Peixe	Padrão	Anti-Carp	Anti-Trout 1	
<i>Arapaima gigas</i>	A	Rápido	2+	0
		Lento	2+	0
<i>Mylossoma</i> sp.	B	Rápido	4+	1+
		Lento	0	2+
<i>Rhytiodus</i> sp.		Rápido	4	1+
		Lento	1+	1+
<i>Rhapiodon</i> sp.		Rápido	3+	1+
		Intermédio	3+	1+
		Lento	3+	3+
<i>Ancistrus</i> sp.	C	1	0	0
		2	0	0
		3	0	0
		4	0	4+
<i>Hypostomus</i> sp.		Rápido	0	1+
		Lento	0	4+
<i>Pterygoplichthys</i> sp.		1	0	2+
		2	0	2+
		3	0	2+
		4	0	2+
<i>Rhamphichthys</i> sp.	D	1	2+	2+
		2	2+	2+
		3	2+	2+
		4	2+	2+

DISCUSSÃO

Os anticorpos antitrua 1 e anticarpa presentes no soro de coelho reagem com determinados antigênicos das hemoglobinas de todos os peixes teleosteos examinados. Aquelas Hbs que não absorveram precipitados significativamente a reatividade do antissoro. A Hb de *Lepidosiren paradoxa*, por outro lado, não parece ter nenhuma atividade antigênica demonstrável com esses soros e deve estar muito distantemente relacionada em suas seqüências de Hb de todos os peixes teleosteos e, neste sentido, explica-se a delimitação da reatividade do antissoro empregado.

Encontramos notável e claro padrão de distribuição de estruturas antigênicas entre as Hbs de peixes que relacionam diretamente tanto as cadeias polipeptídicas das Hbs de truta 1 ou de carpa. Também é notável a ausência de atividade precipitante de qualquer das Hbs de peixe com um potente antissoro de Hb 4 de truta. Como somente um único soro foi estudado, a generalização de tal achado precisa ser encarada com certa precaução, mas a ausência de reatividade sugere a seguinte explicação. A seqüência primária da Hb 4 de truta tem evoluído para um alto grau que exibe pouca semelhança com as seqüências primárias de outras Hbs de peixe que determinam as estruturas antigênicas dessas proteínas reativas com o antissoro de coelho. Desde que argumentos convincentes podem ser feitos de que a antigenicidade de uma proteína reflete primariamente sua superfície (Reichlin, 1975) e a superfície reflete a maioria dos átomos na proteína, conclui-se que a ausência significativa de reatividade causada, expressa que a grande maioria dos resíduos da superfície de Hb 4 de truta é diferente dos resíduos de superfície de todas as outras Hbs de peixe das espécies examinadas.

De modo inverso a presença de atividade de precipitação entre muitas Hbs de peixe com antissoro para Hb 1 de truta e de Hb de carpa sugere que é provável que grandes porções da superfície de tais Hbs possuam grande semelhança de seqüência com Hbs 1 de truta e carpa respectivamente. Comparativamente mais interessante do que essas conclusões, são os padrões de distribuição de reatividade dos dois antissoros empregados.

Os experimentos eletroforéticos e cromatográficos garantem a seguinte interpretação dos dados. Entre as Hbs de peixes caracoides, os determinantes antigênicos relacionados à Hp de carpa são largamente distribuídos nos componentes eletroforéticos anódicos enquanto os determinantes relacionados à truta 1 e distribuídos largamente nos componentes catódicos. As propriedades funcionais dos dois tipos eletroforéticos de Hb foram estudados em *Mylossoma* sp. Isto está refletido no diferente comportamento funcional dos dois componentes como as moléculas anódicas de *Mylossoma* sp. que são Hbs típicas de peixe com um efeito Root e uma alta sensibilidade da afinidade aos fosfatos orgânicos. O componente catódico de *Mylossoma* não possui efeito Bohr e é insensível a fosfatos orgânicos. Isto reflete fielmente as propriedades funcionais das Hbs usadas para deduzir o antissoro empregado; i.e. o componente anódico se assemelha com Hb de carpa enquanto o componente catódico se assemelha à Hb 1 de truta nas características funcionais.

Tais achados sugerem que os gens correspondentes às cadeias polipeptídicas das espécies anódicas e aqueles gens correspondentes às cadeias polipeptídicas de espécies catódicas tem evoluído de gens ancestrais nos quais os produtos do gens preferencialmente se combinam e não se associam ao acaso; i.e. para formar híbridos. É provável que nas células vermelhas de *Mylossoma* sp. como nas células vermelhas de truta (Brunori *et al.*, 1974) ambas as Hbs são encontradas na mesma célula.

Em contraste com esta situação, várias espécies de peixe foram examinadas nas quais a característica dos determinantes antigênicos tanto da truta 1 como de carpa residiam nas mesmas moléculas freqüentemente de mobilidade eletroforética largamente diferente. Isto foi visto com Hbs de peixes *cichlid*, *gymnotid* e *rhamphichthyid*. Nesses casos, as cadeias polipeptídicas produzidas pelo gens em carpa e truta 1 como polipeptídeos são encontrados distribuídos juntos em todas as moléculas de Hb encontradas. As estruturas minuciosas e propriedades funcionais de tais Hbs são de grande interesse.

Finalmente, a mais notável correlação desse estudo envolve a distribuição de antigenicidade específica relacionada às estruturas de truta e os "catfish" de respiração facultativa. Todos os "catfishes" de respiração aérea examinados (exceto *Loricaria* sp.) precipitaram fortemente com soro antitruta 1 e uma dessas Hbs (*Ancistrus* sp.) absorve toda a atividade de precipitação para as outras Hbs de peixe do soro antitruta 1. Em contraste, nenhuma "catfish" de respiração branquial precipitou com soro antitruta 1. Das 3 espécies de Hb axaminadas para a habilidade de absorver atividade da antitruta 1, somente Hb de *Pimelodus* sp. mostrou atividade significativa. Por outro lado, todas as 3 Hbs absorveram significativamente atividade do soro de Hb anticarpa. Assim, parece que os "catfish" de respiração branquial são mais proximamente relacionados à Hb de carpa na semelhança das cadeias polipeptídicas. Claramente, mais do que qualquer outra ordem de peixe estudada, tem sido a evidência nas hemoglobinas que suportam a idéia de que as espécies de "catfish" de respiração branquial e aérea divergiram no sentido evolucionário a um longo tempo atrás.

Há uma aparente relação entre respiração aérea e a presença de uma Hb que precipita com antitruta 1 por um lado e a ausência de tal antigenicidade nos "catfish" de respiração branquial. Se essas relações refletem somente relações de "família" ou se também refletem rigorosamente diferenças funcionais entre estas famílias de peixes é de grande interesse saber.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo GRANT PCM-06451 do National Science Foundation para estudos no R/V "Alpha Helix". Agradecemos aos brasileiros por sua ajuda e por fazer possível o "Alpha Helix" subir o Amazonas. Desejamos agradecer ao capitão Clark e à tripulação por sua cooperação. B.J.D. agradece o financiamento da viagem feito pelo Joseph Henry-Marsh Fund da National Academy of Sciences e da San Francisco State University.

SUMMARY

Utilizing antisera to carp and trout hemoglobins, the hemoglobins of fish common to the Amazon River Basin exhibited extensive cross reactions. While no fish hemoglobin precipitated with antiserum to trout 4 (anodal component), many hemoglobins precipitated with either antisera to trout 1 (cathodal component) or carp hemoglobins. Several patterns of reactivity could be described among the polydisperse hemoglobins of various species which were analyzed by the electrophoretic separation of the components and an assessment of the ability of individual components to reach with the two types of antisera. Most striking was the different reactivity noted amongst the catfishes where the hemoglobins of air-breathing catfishes reacted more strongly with anti-trout 1 serum than with anticarp serum while the hemoglobins of the water-breathing catfishes behaved in reciprocal fashion.

BIBLIOGRAFIA

- BRUNORI, M.; GIARDINA, B.; ANTONINI, E.; BENEDETTI, P.A. & BIANCHINI, G.
1974 — Distribution of the Haemoglobin components of trout blood among the erythrocytes: Observations by single cell spectroscopy. *J. Mol. Biol.* 86, 165-169.
- DAVIS, B. J.
1964 — Disc electrophoresis — II Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- FYHN, U.E.H. & B. SULLIVAN
1975 — Elasmobranch hemoglobins: dimerization and polymerization in various species. *Comp. Biochem. Physiol.* 50B, 119-129.
- REICHLIN, M.
1975 — Amino acid substitution and the antigenicity of globular proteins. *Adv. in Immunol.* 20, 71-119.
- TAN-WILSON, A.; REICHLIN, M.; BRUNORI, M.; & NOBLE, R.W.
1976 — The virtual absence of antigenic cross reactivity between functionally distinct trout hemoglobins. *Eur. J. Biochem.* 71, 125-129.