

Uma reação de precipitina entre soro humano e hemoglobina de peixe (*)

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

Resumo

Uma reação de precipitina em gel de agar (método de Ouchterlony) foi observada entre soro humano normal e hemoglobinas de certos peixes. As evidências acumuladas mostraram que o reatante no soro humano é a fração albumina. A reação exibe considerável especificidade uma vez que metade das hemoglobinas de peixes testados precipitou e metade não precipitou.

INTRODUÇÃO

No curso do estudo das relações imunológicas de hemoglobinas de peixe (Hbs) com antissoro específico de coelho para certas Hbs de peixe, uma reação de precipitação em gel de agar (método de Ouchterlony) foi observada entre soro humano normal e Hb de peixe. O reatante no soro humano foi experimentalmente identificado como albumina. A evidência que sustenta esta teoria foi a seguinte: Laminando gel de poliácridamida no qual o soro humano tinha sido corrido e embebendo lâminas de 0,5 cm dentro de gel de agar revelaram que o reagente no soro humano estava confinado à zona de albumina. Hb de carpa altamente purificada, Hb truta 4, e a fração anódica de Hb de *Mylossoma* sp. todas precipitaram com o fator do soro enquanto Hb 1 de truta e a fração catodal de Hb de *Mylossoma* sp. não precipitaram indicando que a reação é específica para certas hemoglobinas. Hemolisados preparados de 43 espécies de peixes comuns da bacia do rio Amazonas foram separadas por sua habilidade em precipitar com soro humano em gel de agar. Vinte e uma das 43 Hbs testadas foram positivas neste teste. É interessante que há um padrão para a especificidade desta reação. As hemoglobinas de peixes caracídeos e da maior parte dos "catfishes" com respiração aérea acessória, reagiram com soro humano enquanto as Hbs dos gimnotídeos e

ciclídeos não reagiram com soro humano. A distinção mais interessante feita com este parâmetro é que, na família Osteoglossidae a Hb de *Arapaima gigas*, precipita com soro humano enquanto que a Hb de *Osteoglossum bicirrhosum* não precipita.

A significação desta reação peculiar não é aparente. Pode, contudo, servir como uma prova para alguma estrutura de superfície em Hb de peixe e pode também ser um interessante modelo para interações de proteína-proteína.

MATERIAIS E MÉTODOS

O método para difusão em agar, eletroforese analítica em poliácridamida e laminação dos geis de poliácridamida para análise de Hbs reativas foi realizado como descrito por Reichlin *et. al.* (1978).

Nos experimentos de difusão em agar, soro humano não diluído foi colocado no centro do depósito e as Hbs foram separadas como hemolisados com concentrações de Hb variando de 2 a 5 mg%. Soluções diluídas de Hb de menos de 0,5% reagiram pobremente. Os precipitados desenvolveram-se mais ou menos no mesmo índice como imuno precipitado começando a ser visíveis com cerca de 4 a 6 horas e tornando-se totalmente desenvolvidos em 12 a 18 horas na temperatura do laboratório, 30 — 33°C.

RESULTADOS

IDENTIFICAÇÃO DOS REATANTES

Os reatantes do soro humano foram identificados de duas maneiras. O soro humano foi submetido à eletroforese em poliácridamida (7½% gel) em duplicata de gel. Um gel foi colorido para proteína com reagente Coomassie

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

(1) — Departments of medicine and biochemistry, SUNY at Buffalo School of Medicine.

(2) — Departmente of biology, San Francisco State University.

Supported by NIH grant AM10428 and funds from the Veterans Administration MRIS 7386.

Blue, o outro laminado em 20 porções de 5 mm, cada. Os *geis* laminados eram então embebidos em placas de agar fazendo orifícios com um furador de rolha equivalente ao diâmetro das porções de *gel*. Um arranjo geométrico foi combinado de tal forma que cada fração difundia-se contra um orifício de tamanho similar preenchido com Hb de carpa a 2,0%. Somente as frações correspondentes à fração albumina do soro humano precipitaram com Hb de carpa. Esses experimentos foram confirmados pela demonstração de que a albumina cristalina de soro humano (adquirida de Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) em concentrações variando de 1 a 20 mg/ml precipitou com Hb de carpa. Em adição, a albumina humana cristalina deu uma reação de identidade com soro humano quando as duas foram definidas contra Hb de carpa na geometria apropriada. Esses experimentos mostram claramente que o reatante no soro humano é a fração albumina.

Que o reatante nos hemolisados era a Hb, foi indicado por duas observações. A primeira foi que Hb de carpa altamente purificada, Hb IV de truta, a fração anódica de Hb de *Mylossoma* e as frações isoladas de Hb de *Hoplosternum littorale* todas deram linha de precipitação. Além disso, as linhas completamente desenvolvidas eram distintamente vermelhas demonstrando a presença de Hb no precipitado. Finalmente, os precipitados formados em meio líquido entre soro humano e hemolisados (ou fração de Hb purificadas) formavam precipitados vermelhos demonstráveis pela formação de um resíduo sob centrifugação. Esses experimentos demonstraram que o reatante no hemolisado era indubitavelmente a Hb.

ESPECIFICIDADE DA REAÇÃO

A Tabela 1 relaciona as Hbs testadas e suas atividades com soro humano. Vinte e três amostras de Hb foram reativas e 24 amostras não o foram. Algumas diferenças muito interessantes foram absorvidas na reatividade das Hbs de peixe. As frações anódicas de Hb de truta e *Mylossoma* eram reativas enquanto as frações catódica não o eram. A Hb de *Arapaima gigas*, de respiração aérea, precipitou com soro humano enquanto a Hb do proximamento

ligado *Osteoglossum bicirrhosum*, de respiração branquial não precipitou. Hemoglobinas de oito diferentes espécies de "catfish" de respiração exclusivamente aquática de 6 famílias não conseguiram precipitar com soro humano. Em contraste, hemoglobinas de 3 espécies "catfish" de respiração aérea de 2 famílias (*Loricariidae*, *Callichthyidae*) precipitaram com soro humano (*Hoplosternum* sp., *Hyposotomus* sp.) mas 2 outras espécies de loricariídeos tinham Hbs que eram negativas nesta reação (*Ancistrus* sp. e *Pterygoplichthys* sp.). De um modo geral, todas as amostras de Hbs testadas de peixes caracídeos foram reativas com soro humano.

A especificidade da reação do ponto de vista da fonte do soro também foi estudada com alguma amplitude. Somente soro humano dos soros testados era precipitante ativo nesta reação com Hb de peixe. As seguintes variedades de soro animal não precipitaram com Hb de peixe: soros de coelho, bovino, de coabaia, cavalo, carneiro, cabra, rato e carpa.

TABELA 1 — Reatividade de hemoglobinas de peixe com soro humano.

Família	Espécies	Atividade com soro humano *
Potamotrygonidae	Potamotrygon sp.	NR
Lepidosirenidae	Lepidosiren paradoxa	NR
Osteoglossidae	Osteoglossum	
	bicirrhosum	NR
	Arapaima gigas	R
Salmonidae	Salmo gairdneri	
	trout 1	NR
	trout 4	R
Characidae	Mylossoma sp.	
	anodal fraction	R
	cathodal fraction	NR
	Charax sp.	R
	Tripottheus sp.	R
	Serrasalmus sp.	R
	Colossoma sp.	R
Tetragonopterus sp.	R	
Curimatidae	Curimatus sp.	R
Erythrinidae	Hoplias malabaricus	R
	Hoplerythrinus	
	unitaeniatus	R
Cynodontidae	Rhapiodon sp.	R
Prochilodontidae	Prochilodus sp.	R
Anostomidae	Schizodon sp.	R
	Ieporinus sp.	NR

TABELA 1 (continuação)

Hemiodontidae	<i>Hemiodus</i> sp.	R
Gymnotidae	<i>Gymnouts carapo</i>	NR
Rhamphichthyidae	<i>Rhamphichthys</i> sp.	NR
	<i>Sternopygus</i> sp.	NR
Cyprinidae	<i>Cyprinus carpio</i>	R
Doradidae	<i>Opsodoras</i> sp.	NR
	<i>Anadoras</i> sp.	NR
Pimelodidae	<i>Astrodoras</i> sp.	NR
	<i>Rhamdella</i> sp.	NR
	<i>Hemisorubim</i> sp.	NR
Agenelosiidae	<i>Ageneiosus</i> sp.	NR
Auchenipteridae	<i>Trachycorystes</i> sp.	NR
	<i>Auchenipterus</i> sp.	NR
Hypophthalmidae	<i>Hypophthalmus</i> sp.	NR
	<i>Hoplosternum littorale</i>	
	first component	R
	second component	R
Loricariidae	<i>Loricaria</i> sp.	NR
	<i>Ancistrus</i> sp.	NR
	<i>Pterygoplichthys</i> sp.	NR
	<i>Parahemiodon</i> sp.	R
	<i>Hypostomus</i> sp.	R
Synbranchidae	<i>Synbranchus</i>	
	<i>marmoratus</i>	R
Cichlidae	<i>Pterophyllum</i> sp.	NR
	<i>Asteronotus ocellatus</i>	NR

(*) — NR, não reação; R, reação.

DISCUSSÃO

O padrão da especificidade demonstrada entre as hemoglobinas de peixe e albumina de soro sugere que esta reação identifica alguma estrutura de superfície presente em alguns mas não em todos os Hbs de peixes. A estrutura complementar da molécula de albumina está presente apenas na albumina humana entre todas as espécies testadas. Uma reação de precipitação entre albumina de soro humano e uma proteína tissular solúvel, de extratos humanos foi descrita por Tomasi (1960). Aque-la reação era também específica para albumina humana (de um espectro similar de espécies testadas). Uma reação de precipitina em *gel*

de agar entre albumina de soro humano e várias hemoglobinas de mamíferos foi estudada por Kagen (1965) que encontrou um padrão definido de especificidade. Hemoglobinas humanas eram as mais reativas enquanto várias hemoglobinas animais eram menos reativas com albumina de soro humano. Naquela publicação, Hbs de peixe não foram testadas na sua habilidade de precipitar com albumina de soro humano. É provável que a reação descrita neste trabalho e as descritas por Tomasi e Kagen tenham mecanismo similar. A significação desta reação não é aparente. Pode, contudo, servir como uma demonstração para alguma estrutura de superfície em Hb de peixe e também com um interessante modelo de interação de proteína-proteína.

SUMMARY

A precipitin reaction in agar gel (method of Ouchterlony) was noted between normal human serum and certain fish hemoglobins. Evidence was accumulated that the reactant in human serum is the albumin fraction. The reaction exhibited considerable specificity in that about half the fish hemoglobins tested precipitated with human serum and half did not.

BIBLIOGRAFIA

- KAGEN, L.J.
1965 — Reactions between human serum albumin and several hemoglobins. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.* 119, 985-988.
- REICHLIN, M. & DAVIS, B.J.
1978 — Antigenic Relationships Among Fishes Common to the Amazon River Basin. *Comp. Biochem. Physiol.* (this issue).
- TOMASI, T.B.
1961 — A precipitation reaction between human serum and a soluble tissue component. *J. Immunol.* 86, 427-440.