



Caracterização parcial das imunoglobulinas de *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) e de *Colossoma macropomum* (Osteichthyes - Characidae) isoladas com ácido caprílico¹.

Camilo Alberto Corrêa de Vasconcellos Dias²; José Dantas de Góes Filho²; Rafael Rodrigues Costa Oliveira²; Rafael Luckwu de Sousa³; Wallice Luiz Paxiuba Duncan⁴; Eduardo Ono⁵; Luís André Mariúba⁶; Juliana Luiza Varjão Lameiras⁷; Maria Cristina dos-Santos⁸.

Submetido 22/12/2015 – Aceito 24/02/2015 – Publicado on-line 24/08/2015

Resumo

Imunoglobulinas são proteínas produzidas e secretadas por linfócitos B diferenciados em plasmócitos, que atuam neutralizando agentes infecciosos ou seus produtos tóxicos. As imunoglobulinas vêm sendo estudadas há muito tempo e em diversas espécies peixes, havendo um predomínio de pesquisas envolvendo peixes ósseos e cartilagosos marinhos. Entretanto, quando se trata de peixes da Região Amazônica, a quantidade de dados é escassa. No presente estudo, as imunoglobulinas da arraia *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae), representante dos peixes cartilagosos, e do peixe tambaqui (*Colossoma macropomum* - Osteichthyes, Characidae), representante dos peixes ósseos, foram isoladas e parcialmente caracterizadas. Amostras de sangue de animais anestesiados foram coletadas na presença de heparina e os plasmas obtidos, após centrifugação. Os pH das amostras de plasma foram ajustados para 5,0 com ácido acético e adicionado o ácido caprílico para a precipitação das proteínas plasmáticas, exceto as imunoglobulinas. O grau de pureza das imunoglobulinas foi verificado por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE), em amostras com e sem redução. As bandas proteicas encontradas nas amostras purificadas de *C. macropomum* apresentaram massas moleculares aproximadas de 30, 40, 45-60, 70, 190 e 230 kDa. As bandas encontradas nas amostras purificadas de *P. iwamae* apresentaram massas moleculares de aproximadamente 19, 27 e 57 kDa. Após a redução das amostras com 2-mercaptoetanol, foram reveladas bandas mais leves, as quais sugerem que as proteínas isoladas com ácido caprílico são imunoglobulinas. As massas moleculares dessas bandas foram semelhantes às encontradas por outros autores, para imunoglobulinas, em diferentes espécies de peixes ósseos e cartilagosos.

Palavras-Chave: Tambaqui, Arraia de água doce, Bacia Amazônica, Peixes Amazônicos.

¹ Projeto de Iniciação Científica

² Acadêmicos do Curso de Medicina e Bolsistas do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC da Universidade Federal do Amazonas - UFAM

³ Bolsista PET e Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da UFAM

⁴ Professor Doutor do Laboratório de Morfologia Funcional, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFAM. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil

⁵ Doutorando do Programa de Pós-graduação em Aquicultura da Universidade Nilton Lins/ INPA, Manaus, Amazonas, Brasil

⁶ Doutor e Pesquisador do Instituto Leonidas e Maria Deane – ILMD. Rua Terezina, 476. Adrianópolis, CEP 69.057-070, Manaus, Amazonas, Brasil

⁷ Doutoranda do Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da UFAM

⁸ Professora Associada IV do Laboratório de Imunologia, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFAM. Av. Gal. Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, CEP 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil. E-mail: mcsantos@ufam.edu.br



Abstract

Immunoglobulins are proteins that neutralize infectious agents or their toxins. They are produced and secreted by plasma cells, which are differentiated B lymphocytes. Although they have been studied in various species for a some time, there is a shortage of data on these proteins in fish from the Amazon region, as most research in this field involves bony and cartilaginous saltwater fish. In this study immunoglobulins from the freshwater stingray *Plesiotrygon iwamae* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae), a representative of cartilaginous fish, and tambaqui (*Colossoma macropomum*, Osteichthyes - Characidae), a representative of bony fish, were isolated using caprylic acid and partially characterized. Blood samples were collected from anesthetized animals in the presence of heparin, and plasmas were obtained by centrifugation. The pH of the plasma samples was adjusted to 5.0 with acetic acid, and caprylic acid was added to precipitate plasma proteins other than immunoglobulins. The purity of the immunoglobulins was determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in samples with and without reduction. The protein bands observed in the purified samples from *C. macropomum* had molecular weights of approximately 30, 40, 45-60, 70, 190 and 230 kDa, while those observed in the purified samples from *P. iwamae* had molecular weights of approximately 19, 27 and 57 kDa. After reduction of the samples with 2-mercaptoethanol, lower-molecular-weight bands were revealed, suggesting that the proteins isolated with caprylic acid are immunoglobulins. The molecular weights of these bands were similar to those found by other authors for immunoglobulins in different species of bony and cartilaginous fish.

Keywords: “Tambaqui”, freshwater stingray, Amazon basin, Amazonian fish.

1. Introdução

O Sistema Imune é o conjunto de órgãos, células e biomoléculas que desempenham as funções de vigilância e homeostase dos organismos. As imunoglobulinas, também denominadas de anticorpos, são proteínas encontradas na membrana plasmática de linfócitos B (B1, B, BZM - Zona Marginal do Baço) ou secretadas por essas células diferenciadas em plasmoblastos ou plasmócitos (KENNEDY, 2010). Essas proteínas atuam como receptores de antígenos, quando presentes na membrana dessas células ou, quando secretadas, neutralizando agentes infecciosos ou seus produtos ou, ainda, marcando antígenos para serem eliminados pelos demais componentes do sistema imune (SAHA et al., 2010).

As imunoglobulinas constituem uma forma de imunidade humoral cujo descobrimento se deu por ocasião do tratamento eficaz da difteria por Emil Von Behring e Shibasaburo Kitasato, em 1890, realizado com a transferência do soro de animais imunizados para indivíduos infectados. No final do século XIX, início do século XX, Paul Ehrlich postulou a possível presença de receptores (“cadeias laterais”), nas células, capazes de reconhecer os antígenos e, após a interação, produzir moléculas

denominadas de anticorpos. Em 1920, a teoria de Ehrlich começou a ser mais aceita, após os resultados obtidos por Michael Heidelberger e de Oswald Avery, os quais demonstraram que os antígenos eram precipitados por anticorpos e, que estes, eram de origem proteica (VAN EPPS, 2006). Em 1930, a análise detalhada da interação do antígeno com o seu anticorpo foi realizada por John Marrack (MARRACK, 1938). O principal avanço ocorreu em 1940, quando Linus Pauling confirmou a teoria proposta por Ehrlich, mostrando que as interações entre antígenos e anticorpos dependiam mais da conformação química do que de sua composição. Astrid Fagraeus, em 1948, observou que os linfócitos B, transformados em células plasmáticas, eram os responsáveis pela produção de anticorpos (SMITH et al., 2004).

A descoberta da cadeia leve, no início da década de 1960, por Gerald Edelman (EDELMAN; GALLY, 1962), foi importante para a elucidação estrutural das imunoglobulinas. Nesta pesquisa, Gerald demonstrou que os anticorpos são proteínas formadas por cadeias leves e pesadas unidas por pontes dissulfeto. A estrutura de um monômero de imunoglobulina lembra o formato da letra “Y”, com duas regiões de ligações ao antígeno (Fab) e uma cristalizável



e constante (Fc) que se liga aos receptores de células ou interagem com outros elementos do sistema imune para eliminação do antígeno. Essas regiões, Fab e Fc, foram caracterizadas por Rodney Porter, na mesma época da descoberta da cadeia leve. Assim, Gerald e Rodney elucidaram a estrutura completa de aminoácidos da imunoglobulina da classe G (IgG) e, por isso receberam, em 1972, o Prêmio Nobel de Medicina (RAJU, 1999).

Atualmente, sabe-se que as imunoglobulinas surgiram nos vertebrados desprovidos de aparelho maxilo-mandibular, os Agnatos (BOEHM et al., 2012). No entanto, imunoglobulinas produzidas pela recombinação gênica "VDJ" só foram encontradas nos primeiros vertebrados mandibulados, (gnatostomados) (TAKEZAKI et al., 2003), os placodermos, de acordo com descobertas feitas no final do século passado (SCHLUTER et al., 1999). Essa recombinação (VDJ) favoreceu a criação da grande diversidade de imunoglobulinas (as secretadas e as de receptores de linfócitos B) e de receptores de células T, componentes do sistema imune adaptativo (PANCER et al., 2004; ALDER et al., 2005; SAHA et al., 2010). Os primeiros representantes com esse maquinário genético (VDJ) foram os peixes cartilaginosos (por exemplo: tubarões, arraias e quimeras), seguidos pelos peixes ósseos (salmonídeos, bagres, tambaqui, dentre outros) (FLAJNIK, 2010).

Os métodos pelos quais as imunoglobulinas têm sido isoladas do soro abrangem as cromatografias por afinidade, métodos com ácido caprílico e sulfato de amônio. As purificações por cromatografia de afinidade podem ser realizadas em colunas contendo substâncias que interagem seletivamente com o produto a ser isolado, ou com as proteínas bacterianas estafilocócica A e estreptocócica G, que se ligam as imunoglobulinas e não com as demais proteínas séricas (BERGMANN-LEITNER et al., 2008). O método de purificação com o ácido caprílico ocorre em virtude da precipitação de proteínas séricas na presença desse ácido graxo em concentrações e pH adequados, por mecanismos não completamente elucidados, preservando seletivamente as imunoglobulinas como sobrenadante, com alto grau de purificação

(MORAIS; MASSALDI, 2012). O uso do ácido caprílico para precipitar as proteínas do soro, que não sejam imunoglobulinas, foi feito pela primeira vez por Steinbruch e Audran (1969). O método foi eficiente para separar os anticorpos, devido ao seu baixo custo e maior rapidez (PEROSA et al., 1990). Entretanto, a metodologia não foi capaz de isolar todas as classes de imunoglobulinas (OGDEN; LEUNG, 1988). Diversos trabalhos já foram realizados utilizando tal metodologia com a finalidade de purificar parcial ou totalmente as imunoglobulinas (ATANASSOV; BOTEV, 1988; OGDEN; LEUNG, 1988; PEROSA et al., 1990).

Várias classes de imunoglobulinas de peixes cartilaginosos já foram isoladas, por exemplo, IgM, IgW (também conhecida como IgX ou IgNARC) e IgNAR, que é um receptor de antígeno formado, apenas, por duas cadeias pesadas (SMITH et al., 2012; FEIGE et al., 2014). Tais classes foram descritas tanto ligadas à membrana celular ou como secretadas no plasma (DOOLEY; FLAJNIK, 2006; SMITH et al., 2012). Nos peixes ósseos, já foram identificadas IgM, IgD, IgT/IgZ (SALINAS et al., 2011; ZHANG et al., 2011; ZIMMERMAN et al., 2011), sendo a maioria dos estudos realizada em peixes marinhos (GUO et al., 2009; VELIKOVSKY et al., 2009). Whittington (1993) caracterizou parcialmente as imunoglobulinas da perca europeia (*Perca fluviatilis* L.), identificando uma população de imunoglobulinas de alto peso molecular (HMW) variando entre 730-800 kDa, com características de tetrâmero e uma população de baixo peso molecular (LMW) variando entre 220, 180 e 125 kDa. Bagchi e colaboradores (2010) purificaram com sulfato de amônio e caracterizaram IgM do bagre indiano (*Clarias batrachus*). A presença de IgM com diferentes massas moleculares (189, 55 e 27 kDa) e que foram confirmadas quando o anti-IgM de *C. batrachus* foi utilizado.

Em outro estudo, Morrison e Nowak (2001) avaliaram as imunoglobulinas da espécie *Pagrus auratus*, purificadas pelo método de cromatografia por afinidade com proteína estafilocócica A, e as amostras obtidas foram analisadas em SDS-PAGE sem e com redução. Sem redução, foi encontrada uma classe de imunoglobulina com massa



molecular de 766 kDa, que, ao ser reduzida, apresentou duas cadeias pesadas com 71,8 e 67,7 kDa e duas cadeias leves com 30,2 e 29,0 kDa.

Tomonaga e colaboradores (1984) e Kobayashi e colaboradores (1984) analisaram amostras da arraia marinha *Raja kenoei* e identificaram duas classes de imunoglobulinas, uma IgM com massa molecular de 840 kDa e a outra com 320 kDa, utilizando SDS-PAGE.

Pelo exposto há uma grande quantidade de estudos mostrando as diferentes classes de imunoglobulinas isoladas de peixes, sendo a grande maioria dessas pesquisas realizadas com peixes ósseos ou cartilagosos marinhos (DIAZ et al., 1998; ANDERSON et al., 1999; GRUNOW et al., 2013), e pouca com espécies de água doce, mas não foram encontradas referências sobre imunoglobulinas de peixes Amazônicos. Portanto, o presente trabalho teve por finalidade isolar, pelo método do ácido caprílico, e verificar a presença de imunoglobulinas de dois representantes da superclasse Gnathostomata, comuns na Região Amazônica: a arraia de água doce *Plesiotrygon iwamae*, representante dos Chondrichthyes (cartilagosos) e o tambaqui, *Colossoma macropomum*, representante dos Osteichthyes (ósseos).

2. Material e Método

Levantamento bibliográfico - foram utilizadas as palavras-chaves: *Plesiotrygon iwamae*; *Colossoma macropomum*; “immunoglobulin; IgM; IgT; antibody; antibodies; freshwater stingrays; elasmobranchs; ray; fish; immune system”, nos bancos de dados SciVerse, Scopus, Pubmed, Scirus para o período de janeiro de 1987 a novembro de 2014.

Coleta das amostras de sangue do tambaqui, *Colossoma macropomum* - os espécimes foram coletados dos tanques de criação provenientes do Instituto de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Amazonas, Brasil, com auxílio de uma peneira (seis juvenis) e com malhadeira (cinco adultos). Os animais foram anestesiados e, para isso, foram transferidos para tanques contendo Eugenol, na concentração de 50µL/L (juvenis) e de 80µL/L (adultos). Após a confirmação do efeito anestésico, pela flutuação lateral, os indivíduos foram pesados e tiveram amostras de sangue

colhidas da veia caudal, na presença de heparina (Liquemine, Roche®). As amostras de sangue foram mantidas em geladeira a 4°C, por 24 horas e depois, centrifugadas a 6.000rpm, a 25°C, por 5 minutos, para a obtenção dos plasmas. As amostras individuais de plasmas foram armazenadas a -20°C, até o momento do uso.

Coleta da amostra de sangue de *Plesiotrygon iwamae* -. Os animais foram coletados no Lago do Janauacá, município de Manaquiri (03° 51' S/ 55° 59' W), situado a cerca de 60 km a sudoeste da cidade de Manaus, na margem direita do Rio Solimões, Amazonas, Brasil com permissão do IBAMA/SISBIO 22055-2. Amostras de sangue das arraias foram obtidas por meio de punção cardíaca, com seringas individuais contendo heparina, de dez animais adultos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 3.500 rpm, durante 5 minutos, a temperatura ambiente e os sobrenadantes (plasma) separados e estocados em freezer -20°C até o uso.

Purificação das imunoglobulinas – A purificação das imunoglobulinas presentes nos plasmas foi realizada pelo método descrito por Steinbuch e Audran (1969) e modificado por Dos-Santos e colaboradores (1989). O pH das amostras de plasmas foi aferido para 5,0 com ácido acético 0,1M e, então, adicionou-se o ácido caprílico (Merck, Darmstadt) na concentração final de 87%, sob agitação por 30 minutos, a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm e os sobrenadantes foram filtrados em uma membrana de 0,45 µm (Millipore Corporation, Bedford, MA 01730) e estocados a -20°C, até o momento do uso.

Análise das imunoglobulinas – o grau de pureza das imunoglobulinas obtidas das espécies *Plesiotrygon iwamae* e *Colossoma macropomum*, foi verificado pelo método de eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), conforme protocolo usado em Laemmli (1970). Trinta microlitros de cada amostra foram aplicados sobre o gel de empilhamento a 5% de acrilamida e a separação das proteínas foi realizada no gel de corrida com concentração de 7,5% de acrilamida, sob condições redutoras e não-

reduzidas. Antes da eletroforese, as amostras foram misturadas na proporção de 1:1 (v/v) com os respectivos tampões de amostra na presença (amostras reduzidas) ou não de 2-mercaptoetanol. Miosina (205kD), β -galactosidase (121kD), Albumina (86kD), Ovalbumina (50,7kD), Anidrase carbônica (33,6kD), Inibidor soja tripsina (27,8kD), Lisozima (19,4kD) e Aprotinina (7,4kD) (Bio Rad Prestained Marker, Standards Broad Range, USA) foram usadas como marcadores de massa molecular. Os géis foram corados com Coomassie brilhante Blue (Bio-Rad).

3. Resultados e Discussão

Levantamento bibliográfico – Para o período de janeiro de 1987 a novembro de 2014, como esperado, não foram encontradas referências bibliográficas quanto à purificação ou caracterização de imunoglobulinas de *Colossoma macropomum* ou de *Plesiotrygon iwamae*. A revisão buscou dados sobre espécies de peixes ósseos e cartilagenosos cujas imunoglobulinas já tenham sido isoladas e/ou caracterizadas a fim de fornecer informações para discussão dos resultados.

Massas moleculares do plasma de *Colossoma macropomum* - A análise do SDS-PAGE (Figura 1) revela que as amostras de plasma de indivíduos adultos e juvenis apresentaram redução no número de bandas após a purificação com ácido caprílico, indicando que houve precipitação de proteínas do soro e não de imunoglobulinas. Observou-se que ao fazer a redução com 2-mercaptoetanol, o número de bandas aumentou, com uma diminuição das massas moleculares identificadas.

As bandas encontradas após a purificação pelo ácido caprílico foram semelhantes em ambos os grupos, tanto dos adultos quanto dos juvenis, sem a redução (Figura 1), com massas de 230 kDa, 190 kDa, 70 kDa*, 60-45 kDa, 40 kDa, 30 kDa*. (*encontradas no grupo dos animais adultos e não nos juvenis).

As bandas das amostras dos juvenis com redução diferiram das do grupo de animais juvenis sem redução, mostrando bandas com aproximadamente 80 kDa, 70 kDa, 60 kDa, 60-53 kDa, 48-35 kDa, 28 kDa, 7,5 kDa. No grupo de animais adultos, após a

redução da amostra purificada pelo ácido caprílico, o resultado foi similar aos obtidos com as amostras dos animais juvenis, com o acréscimo de bandas de aproximadamente 34 kDa e 32 kDa (Figura 1). Tais achados indicam que as imunoglobulinas isoladas, na presença de 2-mercaptoetanol, tiveram suas cadeias pesadas dissociadas das cadeias leves.

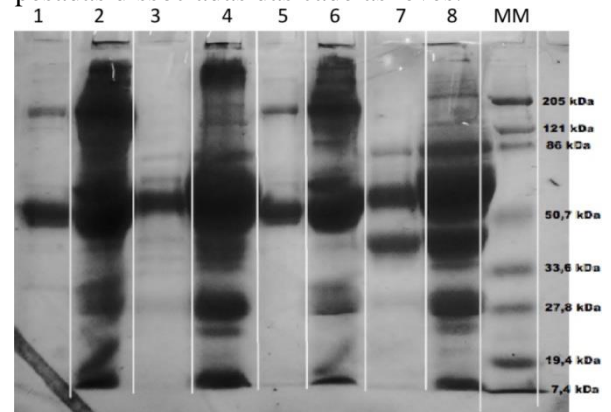


Figura 1 - Gel de eletroforese com amostras de *Colossoma macropomum*: 1) amostra purificada com ácido caprílico do grupo adulto sem redução; 2) amostra íntegra do plasma do grupo adulto sem redução; 3) amostra purificada com ácido caprílico do grupo adulto com redução; 4) amostra íntegra do plasma do grupo adulto com redução; 5) amostra purificada com ácido caprílico do grupo juvenil sem redução; 6) amostra íntegra do plasma do grupo juvenil sem redução; 7) amostra purificada com ácido caprílico do grupo juvenil com redução; 8) amostras íntegras do plasma do grupo juvenil com redução; MM) massa molecular (BioRad®).

Resultados semelhantes foram encontrados em outras espécies de peixes teleósteos. *Latris lineata* apresentou imunoglobulinas íntegras com massa acima de 205 kDa e após a dissociação das cadeias pesadas das cadeias leves, observou-se bandas proteicas de aproximadamente 86 kDa e 28 kDa, respectivamente (COVELLO et al., 2009). A perca europeia (*Perca fluviatilis* L.), apresenta imunoglobulinas com cadeias leves na faixa de 27-28 kDa e pesadas de 72 kDa (WHITTINGTON, 1993), e *Scyliorhinus canicula* apresenta imunoglobulinas com cadeias pesadas de 70 kDa e leves de 25 kDa, com uma massa molecular de 160-200 kDa sem a redução

pelo 2-mercaptoetanol (LLOYD-EVANS, 1993).

Massas moleculares do plasma de *Plesiotrygon iwamae* - No SDS-PAGE (Figura 2), foi identificada uma redução no número de bandas após a precipitação com o ácido caprílico, similar ao resultado obtido com as amostras de *Colossoma macropomum* (Figura 1), demonstrando que houve precipitação das proteínas plasmáticas, exceto as imunoglobulinas.

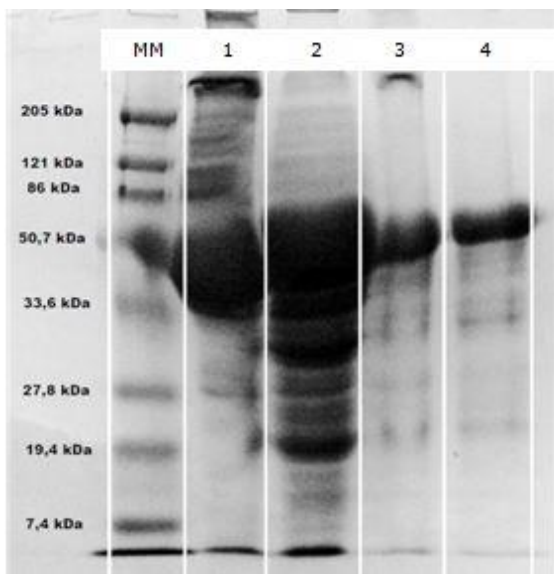


Figura 2 - Gel de eletroforese com amostras de *Plesiotrygon iwamae*. MM) massa molecular BioRad®; 1) amostras íntegras do plasma sem redução; 2) amostras íntegras do plasma com redução; 3) amostras purificadas com o ácido caprílico sem redução; 4) amostras purificadas com o ácido caprílico com redução.

Nas amostras precipitadas com o ácido caprílico, evidenciou-se a presença de uma banda de massa molecular acima da faixa de 205 kDa (que não pode ser quantificada pelos marcadores de massa molecular) bandas entre 65 e 40 kDa e uma banda fraca entre 19 e 30 kDa.

Ao comparar a amostra precipitada pelo ácido caprílico sem redução com a amostra reduzida pelo 2-mercaptoetanol, evidenciou-se o desaparecimento da banda acima da faixa de 205 kDa e o surgimento de mais bandas entre o intervalo de 50,7 kDa e 86 kDa, que, em uma análise preliminar, tem uma

massa molecular de aproximadamente 54 kDa. Houve também o surgimento de bandas mais fortes próximo às faixas de 23 e 30 kDa.

Essa mudança no perfil eletroforético também foi detectada nas amostras íntegras de plasma, com e sem redução, sendo compatível com a ação do 2-mercaptoetanol sobre imunoglobulinas de dissociar as cadeias pesadas das cadeias leves. Corroboramos os resultados para *Plesiotrygon iwamae* aos encontrados na literatura para peixes cartilagosos. A arraia *Raja kenoei* possui anticorpos com uma cadeia pesada de aproximadamente 45-50 kDa, assim como uma massa de 320 kDa antes da dissociação das cadeias pesadas das leves (KOBAYASHI et al., 1984). A espécie *Clamydoselachus anguineus* possui imunoglobulinas com massas de 900 kDa, 300 kDa e 150 kDa, que quando dissociadas pelo 2-mercaptoetanol apresentam-se como bandas de 68 kDa e 45-50 kDa (cadeias pesadas) e 22-24 kDa (cadeias leves) (KOBAYASHI et al., 1992). Imunoglobulinas isoladas de *Ginglymostoma cirratum* foram quantificadas e apresentaram cadeias pesadas de 50 e 72 kDa e leves de 23 kDa (FULLER et al., 1978).

Conclusão

Os resultados encontrados são consistentes com os dados presentes na literatura. Houve uma redução do número de bandas proteicas após o uso do ácido caprílico, nas amostras de plasmas e a dissociação das cadeias leves e pesadas após a utilização do 2-mercaptoetanol, que age quebrando as ligações entre as essas cadeias das imunoglobulinas. Isso indica que o ácido caprílico foi capaz de isolar as imunoglobulinas das amostras de plasma após a precipitação das outras proteínas plasmáticas.

Mais estudos estão em andamento a fim de complementar os resultados encontrados por esta pesquisa, de modo que as imunoglobulinas isoladas pelo uso do ácido caprílico possam ser devidamente caracterizadas, tanto em massa molecular quanto em sua composição de aminoácidos.

Agradecimentos

Ao CNPq e FAPEAM pela concessão das bolsas de Iniciação Científica dos alunos de Graduação.



A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de Bolsa à Juliana Luiza Varjão Lameiras.

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Produtividade (No. 303786/2013-2) à Maria Cristina dos Santos.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ALDER, N. M.; ROGOZIN, I. B.; IYER, L. M.; GLAZKO, G. V.; COOPER, M. D.; PANCER, Z. **Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate.** *Science*, v. 310, n. 5756, p. 1970-1973, 2005.

ANDERSON, M. K.; STRONG, S. J.; LITMAN, R. T.; LUER, C. A.; AMEMIYA, C. T.; RAST, J. P., LITMAN, G. W. **A long form of the skate IgX gene exhibits a striking resemblance to the new shark IgW and IgNARC genes.** *Immunogenetics*, v. 49, p. 56-67, 1999.

ATANASSOV, C. L.; BOTEV, B. A. **Isolation and parcial characterization of IgM-like immunoglobulins from the serum of carp (*Cyprinus carpio* L.), frog (*Rana ridibunda* PALL.) and tortoise (*Testudo graeca* PALL.).** *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 89B, n. 4, p. 737-741, 1988.

BAGCHI, R. A.; PARIKH, P. H.; ROY, N.; PEHLATHIA, R.; MUKHERJEE, J.; BAGCHI, A. K. **Purification and Characterisation of Indian catfish (*Clarias batrachus*) IgM.** *World Journal of Zoology*, v. 5, n. 3, p. 205-209, 2010.

BERGMANN-LEITNER, E. S.; MEASE, M. R.; DUNCAN E. H.; KHAN F.; WAITUMBI J.; ANGOV E.; **Evaluation of immunoglobulin purification methods and their impact on quality and yeld of antigen-specific antibodies.** *Malaria Journal*, doi:10.1186/1475-2875-7-129, 2008.

BOEHM, T.; HESS, I.; SWANN, J. B. **Evolution of lymphoid tissues.** *Trends in Immunology*, v. 33, n. 6, p. 315-321, 2012.

COVELLO, J. M.; MORRISON, R. N.; BATTAGLENE, S. C.; NOWAK, B. F. **Purification and partial characterisation of striped trumpeter (*Latris lineata*) systemic immunoglobulin for the purpose of polyclonal anti-serum production.** *Aquaculture*, v. 287, p. 11-17, 2009.

DIAZ, M.; GREENBERG, A. S.; FLAJNIK, M. K. **Somatic hypermutation of the new antigen receptor gene (NAR) in the nurse shark does not generate the repertoire: possible role in the antigen-driven reactions in the absence of germinal centers.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 24, p. 14343-14348, 1998.

DOOLEY, H.; FLAJNIK, M. F. **Antibody repertoire development in cartilaginous fish.** *Developmental and Comparative Immunology*, v. 30, p. 43-56, 2006.

DOS SANTOS, M. C.; D'IMPÉRIO LIMA, M. R.; FURTADO, G. C.; COLLETO, G. M. D. D.; KIPNIS, T. L.; DIAS DA SILVA, W. **Purification of F(ab')₂ anti-snake venom by caprylic acid: A fast method for obtaining IgG fragments with high neutralization activity, purity and yield.** *Toxicon*, v. 27, n. 3, p. 297-303, 1989.

EDELMAN, G.M., GALLY, J.A. **The nature of Bence-Jones proteins. Chemical similarities to polypeptide chains of myeloma globulin sand normal gamma-globulins".** *J. Exp. Med.* 116(2):207-227, 1962.

FEIGE, M.J.; GRÄWERT, M.A.; MARCINOWSKI, M.; HENNIG, J.; BEHNKE, J.; AUSLÄNDER, D.; HEROLD, E.M.; PESCHEK, J.; CASTRO, C.D.; FLAJNIK, M.; HENDERSHOT, L.M.; SATTTLER, M.; GROLL, M.; BUCHNER, J. **The structural analysis of shark IgNAR antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) Journal*, v. 111. n. 22, 2014.

FLAJNIK, M. F. **All GOD's creatures got dedicated mucosal immunity.** *Nature Immunology*, v. 11, p. 777-779, 2010.



- FULLER, L.; MURRAY, J.; JENSEN, J. A. **Isolation from nurse shark serum of immune 7S antibodies with two different molecular weight H-chains.** *Immunochemistry*, v. 15, p. 251-259, 1978.
- GRUNOW, B., BÖHMERT, B.; FECHNER, K. **Specificity of antibodies established from mammals in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).** *Journal of Applied Ichthyology*. doi: 10.1111/jai.12146, 2013.
- GUO, P.; HIRANO, M.; HERRIN, B. R.; LI, J.; YU, C.; SADLONOVA, A.; COOPER, M. D. **Dual nature of the adaptive immune system in lampreys.** *Nature*, v. 459, n. 0, p. 796-801, 2009.
- KENNEDY, M. A. **A Brief Review of the Basics of Immunology: the Innate and Adaptative Response.** *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 40, p. 369-379, 2010.
- KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S.; KAJII, T. **A second class of immunoglobulin other than IgM present in the serum of a cartilaginous fish, the skate, *Raja kenoei*: Isolation and Characterization.** *Molecular Immunology*, v. 21, n. 5, p. 397-404, 1984.
- KOBAYASHI, K.; TOMONAGA, S.; TANAKA, S. **Identification of a second immunoglobulin in the most primitive shark, the frill shark, *Chlamydoselachus anguineus*.** *Developmental and Comparative Immunology*, v. 16, n. 4, p. 295-299, 1992.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4.** *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LLOYD-EVANS, P. **Purification and characterization of high molecular weight (HMW) and low molecular weight (LMW) immunoglobulins from the serum of the dogfish, *Scyliorhinus canicula*, and the identification of antibody forming tissues.** *International Journal of Biochemistry*, v. 25, n. 12, p. 1823-1833, 1993.
- MARRACK, J.R. **Chemistry of antigens and antibodies (2nd ed.).** London: His Majesty's Stationery Office. 1938.
- MORAIS, V.; MASSALDI, H. **A model mechanism for protein precipitation by caprylic acid: Application to plasma purification.** *International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Volume 50, number 3*, 2012.
- MORRISON, R. N.; NOWAK, B. F. **Affinity purification and partial characterisation of systemic immunoglobulin of the snapper (*Pagrus auratus*).** *Aquaculture*, v. 201, p. 1-17, 2001.
- OGDEN, J. R.; LEUNG, K. **Purification of murine monoclonal antibodies by caprylic acid.** *Journal of Immunological Methods*, v. 111, p. 283-284, 1988.
- PANCER, Z.; AMEMIYA, C. T.; EHRHARDT, G. R.; CEITLIN, J.; GARTLAND, G. I.; COOPER, M. D. **Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey.** *Nature*, v. 430, n. 6996, p. 174-180, 2004.
- PEROSA, F.; CARBONE, R.; FERRONE, S.; DAMMACCO, F. **Purification of immunoglobulins by sequential precipitation with caprylic acid and ammonium sulphate.** *Journal of Immunological Methods*, v. 128, p. 9-16, 1990.
- RAJU, T.N. **The Nobel chronicles. 1972: Gerald M Edelman (1929) and Rodney R Porter (1917-85)".** *Lancet*, 354(9183):1040, 1999.
- SAHA, N. R.; SMITH, J.; AMEMIYA, C. T. **Evolution of adaptive immune recognition in jawless vertebrates.** *Seminars in Immunology*, v. 22, n. 0, p. 25-33, 2010.
- SALINAS, I.; ZHANG, Y.-A.; SUNYER, J. O. **Mucosal immunoglobulins and B cells of teleost fish.** *Developmental & Comparative Immunology*, v. 35, n. 12, p. 1346-1365, 2011.
- SCHLUTER, S. F.; BERNSTEIN, R. M.; BERNSTEIN, H.; MARCHALONIS, J. J. **'Big Bang' emergence of the combinatorial immune system.** *Developmental and Comparative Immunology*, v. 23, p. 107-111, 1999.
- SMITH, L. E.; CROUCH, K.; CAO, W.; MÜLLER, M. R.; WU, L.; STEVEN, J.; LEE, M.; LIANG, M.; FLAJNIK, M. F.; SHIH, H. H.; BARELLE, C. J.; PAULSEN, J.; SILVERSTEIN, A.M. **Labeled antigens and antibodies: the evolution of magic marker and magic bullets.** *Nat. Immunol.*, 5(12):1211-1217, 2004.



SMITH, L.E.; CROUCH, K.; CAO, W.; MÜLLER, M.R.; WU, L.; STEVEN, J.; LEE, M.; LIANG, M.; FLAJNIK, M. F.; SHIH, H.H.; BARELLE, C.J.; PAULSEN, J.; GILL, D. S.; DOOLEY, H. **Characterization of the immunoglobulin repertoire of the spiny dogfish (*Squalus acanthias*)**. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 36, n. 4, p. 665-679, 2012.

STEINBUCH, M.; AUDRAN, R. **The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.134, p. 279-284, 1969.

TAKEZAKI, N.; FIGUEROA, F.; ZALESKA-RUTCZYNSKA, Z.; KLEIN, J. **Molecular phylogeny of early vertebrates: monophyly of the agnathans as revealed by sequences of 35 genes**. *Molecular Biology and Evolution*, v. 20, p. 287-292, 2003.

TOMONAGA, S.; KOBAYASHI, K.; KAJII, T.; AWAYA, K. **Two populations of immunoglobulin-forming cells in the skate *Raja kenoei*: their distribution and characterization**. *Developmental and Comparative Immunology*, v. 8, p. 803-812, 1984.

VAN EPPS, H.L. **Michael Heidelberger and the demystification of antibodies**. *J. Exp. Med.*, 203(1):5, 2006.

VELIKOVSKY, C. A.; DENG, L.; TASUMI, S.; IYER, L. M.; KERZIC, M. C.; ARAVIND, L.; PANCER, Z.; MARIUZZA, R. A. Structure of a lamprey variable lymphocyte receptor in complex with a protein antigen. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v. 16, n. 7, p. 725-730, 2009.

WHITTINGTON, R. J. **Purification and partial characterization of serum immunoglobulin of the European perch (*Perca fluviatilis* L.)**. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 3, p. 331-343, 1993.

ZHANG, Y.; SALINAS, I.; SUNIER, J. O. **Recent findings on the structure and the function of teleost IgT**. *Fish and Shellfish Immunology*, v. 31, n. 5, p. 627-634, 2011.

ZIMMERMAN, A. M.; MOUSTAFA, F. M.; ROMANOWSKI, K. E.; STEINER, L. A. **Zebrafish immunoglobulin IgD: Unusual exon usage and quantitative expression profiles with IgM and IgZ/T heavy chain isotypes**. *Molecular Immunology*, v. 48, n. 15-16, p. 2220-2223, 2011.