

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Purificação de imunoglobulinas dos peixes ósseos (tambaqui - *Colossoma macropomum* e pirarucu - *Arapaima gigas*) e cartilaginoso (arraia - *Plesiotrygon iwamae*) pelos métodos de precipitação com o ácido caprílico e afinidade com proteínas A ou G.

Bolsista: José Dantas de Góes Filho, CNPq

MANAUS
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-B/0067/2013

Purificação de imunoglobulinas dos peixes ósseos (tambaqui - *Colossoma macropomum* e pirarucu - *Arapaima gigas*) e cartilaginoso (arraia - *Plesiotrygon iwamae*) pelos métodos de precipitação com o ácido caprílico e afinidade com proteínas A ou G.

Bolsista: José Dantas de Góes Filho, CNPq
Orientadora: Prof. Doutora Maria Cristina dos Santos

MANAUS
2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Departamento de apoio a Pesquisa e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Resumo

O presente trabalho visou caracterizar as imunoglobulinas de espécies selecionadas como representantes de peixes ósseos e peixes cartilagosos da região Amazônica, com possíveis implicações para a piscicultura e comércio regionais dessas espécies, além de compará-las com outros *taxa* de peixes de água doce, marinhos e mesmo com outros animais. As imunoglobulinas foram obtidas a partir de plasma ou de soro pelo método da precipitação com o ácido caprílico, cujo produto foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida. As espécies escolhidas foram a arraia *Plesiotrygon iwamae*, peixe cartilaginoso; e o pirarucu (*Arapaima gigas*), peixe ósseo. O padrão de bandas evidenciadas na eletroforese permite levantar a hipótese de que o ácido caprílico realizou a purificação de anticorpos, que possivelmente são compostos por cadeias leves e pesadas. Conclui-se, porém, que para elucidação das classes imunoglobulinas presentes nos plasmas das espécies estudadas será necessário à análise de aminoácidos de cada proteína isolada.

Palavras-chave: Anticorpos, Pirarucu, Plesiotrygon, Ácido caprílico

Abstract

The present study aimed to characterize the Immunoglobulins of selected representative species of cartilaginous fish and bony fish from Amazon, with possible consequences for local fish breeding and commerce of such species, as well as to compare such data with that of other *taxa* of freshwater fish, seawater fish and even other animals. The Immunoglobulins were obtained from plasma or serum through the precipitation by caprylic acid method, of which product was analyzed in a polyacrylamide gel through electrophoresis. The selected species consist of the stingray *Plesiotrygon iwamae*, a cartilaginous fish; and the pirarucu (*Arapaima gigas*), a bony fish. The evidenced electrophoretic pattern allows a hypothesis in which the caprylic acid has purified these antibodies from serum, which are probably composed by a light chain and a heavy chain. We conclude, however, that it's necessary to analyze the sequence of amino acids in each purified protein, in order to clarify the classes of the antibodies from these species.

Key-words: Antibodies, Pirarucu, Plesiotrygon, Caprylic acid

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	10
2.1 Coleta de amostras	10
2.2 Isolamento de imunoglobulinas	10
2.3 Método de eletroforese	11
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	11
REFERÊNCIAS	15

1. Introdução

O sistema imune é o conjunto de órgãos, células e biomoléculas que desempenha as funções de vigilância e homeostase dos organismos vivos. As imunoglobulinas, também chamadas de anticorpos, são proteínas secretadas por células do sistema imune, os linfócitos B (B1, B2, ZM) diferenciados em plasmócitos, que atuam neutralizando agentes infecciosos ou seus produtos (toxinas) (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 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 conseqüentemente, tais compostos eram de origem proteica (VAN EPPS, 2006). Na década de 30, do século XX, 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 Fagreaus, em 1948, observou que as células B, transformadas em células plasmáticas, eram as responsáveis pela produção de anticorpos (SILVERSTEIN, 2004).

Outro grande avanço nos estudos sobre imunoglobulinas foi a descoberta da cadeia leve dos anticorpos, no início da década de 60 por Gerald Edelman (EDELMAN; GALLY,

1962). Nesta pesquisa Gerald demonstrou que os anticorpos são proteínas formadas por cadeias leves e pesadas unidas por pontes dissulfeto. Na mesma época, as regiões Fab e Fc da IgG foram caracterizadas por Rodney Porter. Assim Geral e Rodney elucidaram a estrutura completa de aminoácidos da imunoglobulina da Classe G e, por isso receberam, em 1972, com Prêmio Nobel de Medicina (RAJU, 1999).

Quanto o aspecto evolutivo, as imunoglobulinas surgiram nos vertebrados desprovidos de aparelho maxilo-mandibular, os Ágnatos (BOEHM et al., 2011). No entanto, a recombinação gênica VDJ (RAG-dependente) só ocorreu nos vertebrados mandibulados, e essa recombinação favoreceu a formação da grande diversidade de imunoglobulinas (receptores de linfócitos B) e de receptores de células T, do sistema imune adaptativo (SAHA et al., 2010; PANCER et al., 2004; ALDER et al., 2005).

Várias classes de imunoglobulinas já foram isoladas de peixes cartilaginosos, por exemplo, IgM, IgW (também conhecida como IgX ou IgNARC) e IgNAR (SMITH et al., 2012). Tais classes foram descritas tanto ligadas à membrana celular como secretadas no plasma (DOOLEY; FLAJNIK, 2006). A análise da estrutura química da IgNAR foi recentemente elucidada e é um receptor de antígeno formado apenas por homodímeros de cadeias pesada (FEIGE et al., 2014) 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 com peixes marinhos (GUO et al., 2009; VELIKOVSKY et al., 2009).

Os métodos pelos quais as imunoglobulinas têm sido isoladas do soro de peixes abrangem as cromatografias por afinidade, métodos com ácido caprílico e sulfato de amônio. As purificações por cromatografia por afinidade podem ser realizadas em colunas contendo substâncias que interagem seletivamente com o produto a ser isolado, tal como as proteínas bacterianas estafilocócica A e estreptocócica G, ao interagirem com as imunoglobulinas e não

com 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 et al, 2012).

As espécies de peixes cujos anticorpos foram caracterizados são majoritariamente espécies de água salgada como a truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e diversas espécies de tubarões e carpas (GRUNOW, 2013; YAMASAKI, 2013), havendo, porém, quantidade escassa de dados sobre as imunoglobulinas de peixes de água doce, com poucas espécies estudadas, como o jundiá *Rhamdia quelen* (MONTEIRO, 2012). Porém, não foram encontradas no levantamento bibliográfico, para elaboração deste relatório, referências sobre imunoglobulinas de peixes Amazônicos.

Por isso, o presente trabalho visou caracterizar as imunoglobulinas de espécies selecionadas como representantes de peixes ósseos e peixes cartilagosos desse habitat, com possíveis implicações para a piscicultura e comércio regionais dessas espécies, além de compará-las com outros *taxa* de peixes de água doce, marinhos e mesmo com outros animais. As imunoglobulinas foram obtidas a partir de plasma ou de soro pelo método do ácido caprílico, realizado pioneiramente por STEINBRUCH e AUDRAN (1969). As espécies de peixes escolhidas foram a arraia *Plesiotrygon iwamae* e o pirarucu (*Arapaima gigas*). O tambaqui (*Colossoma macropomum*) foi estudado separadamente pelos autores em fase anterior a este estudo. A seleção de tais espécies se deu em função da ausência de estudos sobre os aspectos imunológicos dessas espécies Amazônicas, conforme evidenciado por revisão da literatura científica nas bases de dados *Scopus*, *Scirus*, *Pubmed*, *Lilacs* e *Portal Periódicos Capes*, buscando dados de Janeiro de 1987 a Julho de 2014; e do espectro de avaliação ao se comparar dados de um peixe cartilaginoso (a arraia, da classe Chondrichthyes)

com peixes ósseos (o pirarucu, da superclasse Gnathostomata). Buscou-se avaliar o grau de pureza, das imunoglobulinas isoladas pelo ácido caprílico, pelo método de eletroforese, em gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).

2. Materiais e métodos

2.1 Coleta de amostras

Amostras de sangue de *Arapaima gigas* foram coletadas com seringas individuais contendo heparina, de seis animais adultos, mantidos em cativeiro, no Instituto de Pesquisa da Amazônia (INPA). Amostras de sangue de *Plesiotrygon iwamae* foram obtidas com seringas individuais contendo heparina de dez animais adultos, coletados no Lago do Janauacá, situado a cerca de 60 km a sudoeste da cidade de Manaus, na margem direita do Rio Solimões. As amostras de sangue de 2 exemplares de *Arapaima gigas* e um exemplar de *Plesiotrygon iwamae* foram centrifugadas a 3.500 rpm, durante 5 minutos, temperatura ambiente e os sobrenadantes (plasma) separados e estocados em freezer -200C até o uso. As amostras de plasma foram cedidas pelos pesquisadores: Prof. Doutor Wallace Luiz Paxiúba Duncan (DM/ ICB/ UFAM) e Professor Doutor Oscar Tadeu Ferreira da Costa (DM/ ICB/ UFAM).

2.2 Isolamento das imunoglobulinas

A purificação das imunoglobulinas presentes nos plasmas foi realizada pelo método de isolamento com o ácido caprílico descrito por Steinbuch e Audran (1969) e modificado por Dos-Santos et al., 1989. Logo após o ajuste do pH dos sobrenadantes para 5,0 com ácido acético adicionou-se o ácido caprílico (Merck, Darmstadt) na concentração final de 8.7%, sob agitação por 30 min a temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 14.000 rpm, e os sobrenadantes foram separados do material precipitado para posterior análise do seu perfil eletroforético. A purificação em coluna de cromatografia por afinidade com proteína estafilocócica A foi realizada em uma coluna com resina contendo a

proteína bacteriana A, cujo monômero é capaz de se ligar a duas moléculas de Imunoglobulina G (IgG), por dois métodos similares, o Low Salt e o High Salt, que diferem quanto à adição de NaCl à amostra (BERGMANN-LEITNER et al, 2008). No método Low Salt, o pH da amostra foi levado a 8 pela adição de 1/10 do volume da amostra de solução 1 molar (M) de trisaminometano (Tris) e então a amostra foi adicionada à coluna, sendo essa lavada primeiramente com solução de 100 mM de Tris e então com solução de 10 mM de Tris. A coluna foi então eluída com solução 100 mM de glicina (pH 3) de modo que o conteúdo gotejado pela coluna foi acumulado em eppendorfs de 1,5 ml cada, aos quais 50 L de solução 1 M de Tris foi adicionado previamente. Os eppendorfs foram levemente agitados para levar o pH das soluções à neutralidade, e foi utilizado de imediato o teste de Bradford dye binding spot (BRADFORD, 1979) para averiguar a presença de proteínas nas soluções derivadas da coluna. No método High Salt, a concentração de NaCl da amostra foi ajustada para 3,3 M e adicionou-se, então, solução de borato de sódio (pH 8,9) em 1/10 do volume da amostra. A amostra foi então adicionada à coluna, lavada primeiramente com solução 3 M de NaCl e 50 mM de borato de sódio (pH 8,9) e então com solução 3 M de NaCl e 10 mM de borato de sódio (pH 8,9), sendo a eluição da coluna e os passos seguintes iguais aos do método Low Salt. A purificação em coluna de cromatografia por afinidade com proteína estreptocócica G utiliza exatamente o mesmo protocolo da purificação com proteína A, porém a coluna passa a conter a resina com a proteína G. O teste Bradford dye binding spot não revelou quantidade detectável de imunoglobulinas no purificado pelos métodos de cromatografia, de modo que os resultados desses deixaram de ser considerados nesse estudo.

2.3 Método de eletroforese

O método de eletroforese, usada para averiguar o grau de pureza das imunoglobulinas, foi feito utilizando-se gel de poliacrilamida, na presença de dodecil sulfato de sódio(SDS-

PAGE), conforme protocolo usado em LAEMMLI (1970). Foram aplicados 15 μ L de cada amostra, no gel de poliacrilamida na concentração de 10%, sob condições redutoras (amostras que receberam a solução B, redutora) e não-redutoras (amostras que receberam a solução A, não-redutora). Antes da eletroforese, as amostras foram misturadas na proporção de 1:1 (v/v) nos seus respectivos tampões de amostra. Miosina (200kD), β -galactosidase (116,3kD), Albumina (66,2kD), Ovalbumina (45kD), Anidrase carbônica (31kD), Inibidor soja tripsina (21,5kD), Lisozima (14,4kD) e Aprotinina (6,5kD) (BioRadPrestainedMarker, Standards Broad Range, USA) foram usadas como marcadores de peso molecular. Os géis foram corados com Comassie brilhante Blue (Bio-Rad).

3. Resultados e discussão

A execução dos métodos de isolamento pelo ácido caprílico e subsequente eletroforese do material isolado geraram os padrões de banda, por espécie, conforme é ilustrado nas figuras 1 e 2.

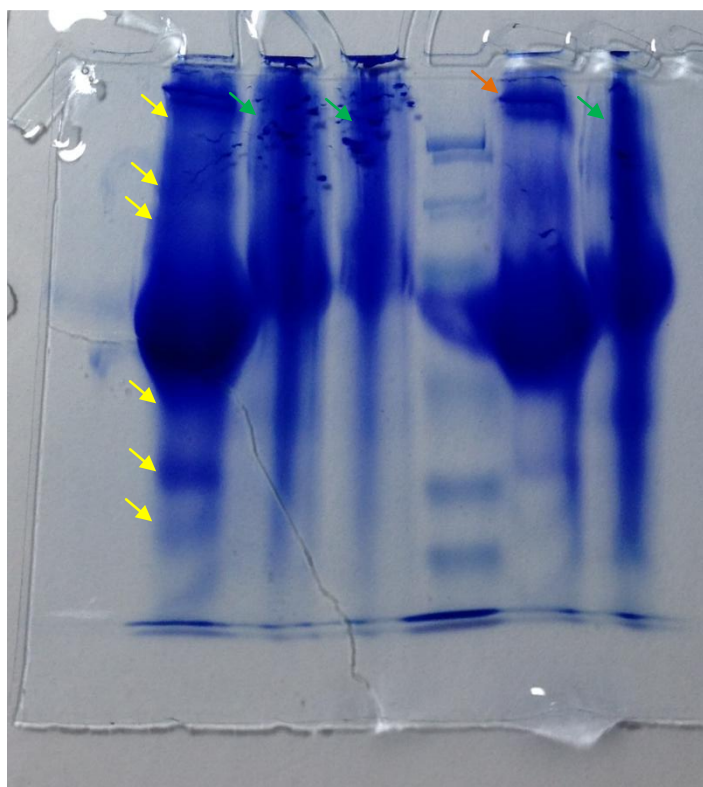


Figura 1 - Padrão de bandas do material isolado de *Plesiotrygon iwamae*. A primeira coluna, à esquerda, conteve plasma bruto do animal com solução A. A segunda e terceira colunas seguintes contiveram plasma bruto com solução B, o qual foi repetido para evidenciar possível viés no método. A quarta coluna exibe a solução de peso molecular padrão. A quinta coluna conteve o produto do isolamento pelo ácido caprílico, com solução A. A sexta coluna conteve o produto do isolamento com ácido caprílico com solução B. As setas de coloração similar indicam bandas de perfil similar (vide texto).

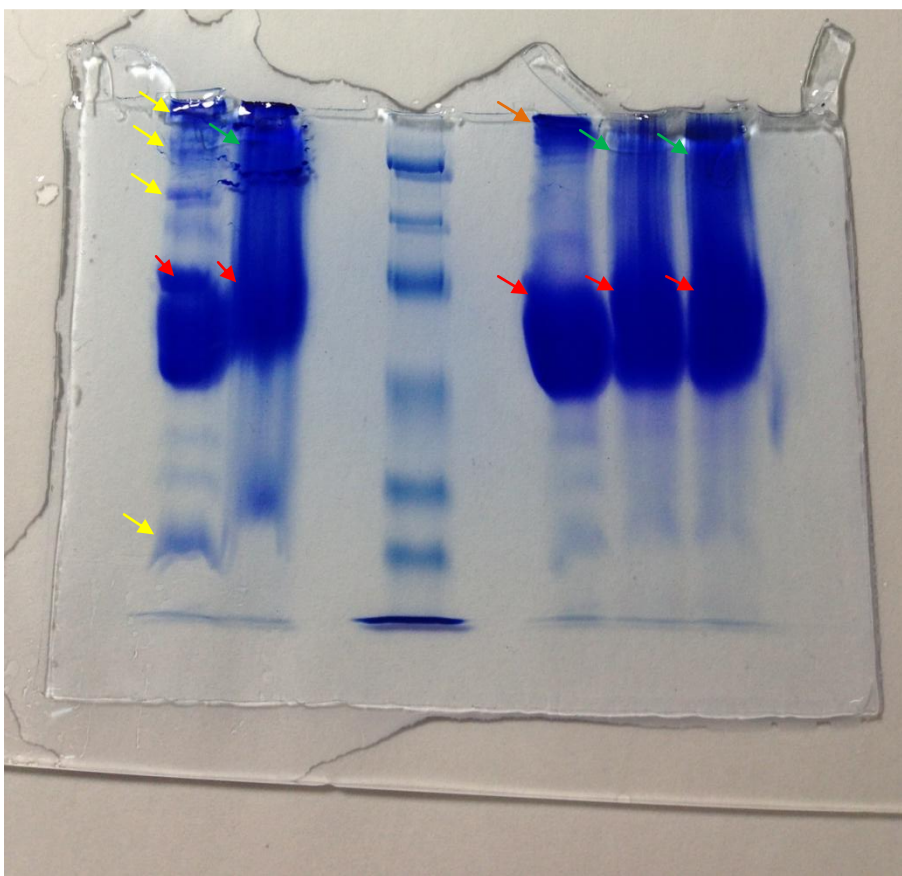


Figura 2 - Padrão de bandas do material isolado de *Arapaima gigas*. A primeira coluna, à esquerda, conteve plasma bruto do animal com solução A. A segunda e coluna, seguinte, conteve plasma bruto com solução B. A terceira coluna exhibe a solução de peso molecular padrão. A quarta coluna conteve o produto do isolamento pelo ácido caprílico, com solução A. A quinta e a sexta colunas contiveram o produto do isolamento com ácido caprílico com solução B, o qual foi repetido para evidenciar possível viés no método. As setas de coloração similar indicam bandas de perfil similar (vide texto).

A análise dos padrões de migração permite concluir que o ácido caprílico levou a uma alteração no perfil eletroforético dos constituintes do plasma bruto, com perda de determinadas bandas (indicadas por setas amarelas nas figuras 1 e 2), o que se presume ser a precipitação de todas as proteínas não imunoglobulinas, tal como descrito por

Steinbuch e Audran (1969). As diferenças entre o material com solução não-redutora (solução A) e redutora (solução B) são evidências adicionais de que as colunas que continham o purificado pelo ácido caprílico exibem anticorpos, pois em condições redutoras, as imunoglobulinas tem suas pontes dissulfeto reduzidas em grupamentos tiol, o que gera a degradação da proteína multissubunitária final em seus constituintes de cadeia leve e pesada. Observa-se, ainda, um aumento de proteínas de menor peso molecular nas condições de redução, evidenciado pela substituição de bandas bem delimitadas de proteínas de maior peso molecular (indicadas por setas laranja nas figuras 1 e 2) por um padrão difusamente concentrado de proteínas de menor peso molecular, quando há redução (indicado pelas setas verdes nas figuras 1 e 2). Cabe ressaltar que as diferenças entre as mesmas amostras, quando reaplicadas em poços diferentes do mesmo gel, assim como a aparente difusão de coloração entre as colunas e em seu transcorrer (vide figura 1), sugerem um possível viés no método, não previsto pelos pesquisadores, o que gera a necessidade de repetição dos procedimentos para confirmação dos resultados. Os pesos moleculares aproximados das proteínas de determinadas bandas foram calculados a partir de função que considera a migração, em centímetros, proporcional ao peso molecular, em kilodaltons (kDa), dos constituintes da solução de peso molecular padrão. Em *Arapaima gigas*, o dado mais notável é a manutenção de uma região extremamente densa cujos constituintes variam entre 75 kDa e 50 kDa (indicada pelas setas vermelhas na figura 2), tanto em condições de redução, como sem redução. Também se observa a perda, no produto isolado pelo ácido caprílico, de banda de peso entre 441 kDa e 383 kDa, quando ocorre redução, dando lugar ao padrão difuso já mencionado. Tais dados permitem levantar a hipótese de que o ácido caprílico realizou a purificação de anticorpos, que possivelmente são compostos por cadeias leves e pesadas. Conclui-se, porém, que é imperativo que tais dados sejam corroborados pela análise de aminoácidos de cada imunoglobulina isolada.

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.

ALVAREZ-PELLITERO, P. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 126, n. 3–4, p. 171-198, 2008.

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 yield 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.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

CARVALHO, M. R.; RAGNO, M. P. An unusual dwarf new species of Neotropical freshwater stingray, *Plesiotrygon nana* sp. nov., from the upper and mid Amazon basin: the

second species of Plesiotrygon (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, v. 51, n. 7, p. 101-138, 2011.

CONCEIÇÃO, K.; SANTOS, J. M.; BRUNI, F. M.; KLITZKE, C. F.; MARQUES, E. E.; BORGES, M. H.; MELO, R. L.; FERNANDEZ, J. H.; LOPES-FERREIRA, M. Characterization of a new bioactive peptide from *Potamotrygon* gr. *orbignyi* freshwater stingray venom. *Peptides*, v. 30, n. 12, p. 2191-2199, 2009.

DOOLEY, H.; FLAJNIK, M. F. Antibody repertoire development in cartilaginous fish. *Developmental & Comparative Immunology*, v. 30, n. 1-2, 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 and normal gamma-globulins". *J. Exp. Med.* 1962; 116(2):207-227.

FEIGE et al. 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.

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.

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.

GRUNOW, B., BÖHMERT, B.; FECHNER, K. (2013), Specificity of antibodies established from mammals in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Applied Ichthyology*. doi: 10.1111/jai.12146, 2013.

HADDAD, V.; NETO, D. G.; NETO, J. B. P.; MARQUES, F. P. L.; BARBARO, K. C. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom, *Toxicon*, v. 43, n. 3, p. 287-294, 2004.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

MAGALHÃES, K. W.; LIMA, C.; PIRAN-SOARES, A. A.; MARQUES, E. E.; HIRUMALIMA, C. A.; FERREIRA, M. F. Biological and biochemical properties of the Brazilian *Potamotrygon* stingrays: *Potamotrygon cf. scobina* and *Potamotrygon gr. orbignyi*. *Toxicon* v. 47, p. 575–583. 2006

MARRACK, J.R. Chemistry of antigens and antibodies (2nd ed.). London: His Majesty's Stationery Office. 1938

MASATOSHI, Y.; KYOSUKE, A.; TERUYUKI, N.; CHIHAYA, N.Y.; YOSHIURA, T.; IIDA, A. Y. Adaptive immune response to *Edwardsiella tarda* infection in ginbunacruian carp, *Carassius auratus langsdorffii*, *Veterinary Immunology and Immunopathology*. ISSN 0165-2427, 10.1016/j.vetimm.2013.02.004, 2013

MCKINNEY, C. E. Shark lymphocytes: Primitive antigen reactive cells. *Annual Review of Fish Diseases*, v. 2, n. 0, p. 43-51, 1992.

MONTEIRO, A. R.; FRANDOLOSO, R.; BARCELLOS, L. J. G. Purificação e caracterização de imunoglobulinas séricas do jundiá. XXII Mostra de Iniciação Científica, 2012.

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.

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.

RAJU, T.N. The Nobel chronicles. 1972: Gerald M Edelman (1929) and Rodney R Porter (1917-85)". *Lancet*, 1999; 354(9183):1040.

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.

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 sand magic bullets. *Nat. Immunol.* 2004; 5(12):1211-1217.

STEINBRUCH, M.; AUDRAN, R. The isolation of IgG from mammalian sera with the aid of caprylic acid. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 134, n. 2, p. 279-284, 1969.

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

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.

ZHANG, Y.-A.; SALINAS, I.; ORIOL SUNYER, J. Recent findings on the structure and function of teleost IgT. *Fish & 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.