

CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES GAMA-GLOBULINA E IgG PURIFICADAS POR IMUNOELETOFORESE

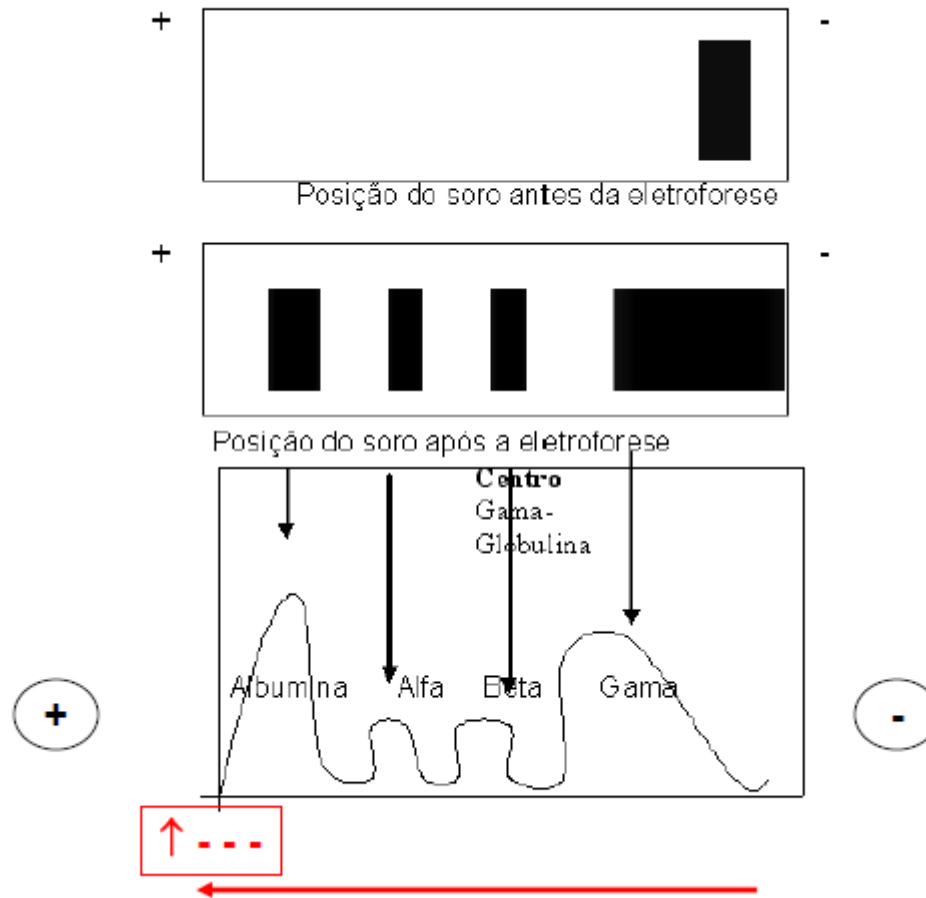
Prof. Helio José Montassier

TÉCNICA DE IMUNOELETROFORESE

- A Imunoeletroforese é a combinação da técnica de **eletroforese** com a técnica de **dupla difusão em gel de ágar**;
- A Imunoeletroforese caracteriza-se por ser uma técnica que permite a discriminação de substâncias presentes em uma mistura complexa com base nas suas **cargas elétricas, pesos moleculares, tamanhos, formas, concentrações e propriedades antigênicas**.
- O método original descrito por Grabar e William (1953-54) para Imunoeletroforese recomenda que ela seja feita em gel de ágar, procedendo-se na **primeira etapa à separação eletroforética** dos componentes e, a seguir, **cada componente se difunde**, a partir de seu centro de difusão, contra o imune-soro, formando, como na dupla imunodifusão, uma **linha ou arco de precipitação**.

Assim, a técnica de imunoelektroforese permite a caracterização de uma substância simultaneamente por meio principalmente de 3 parâmetros:

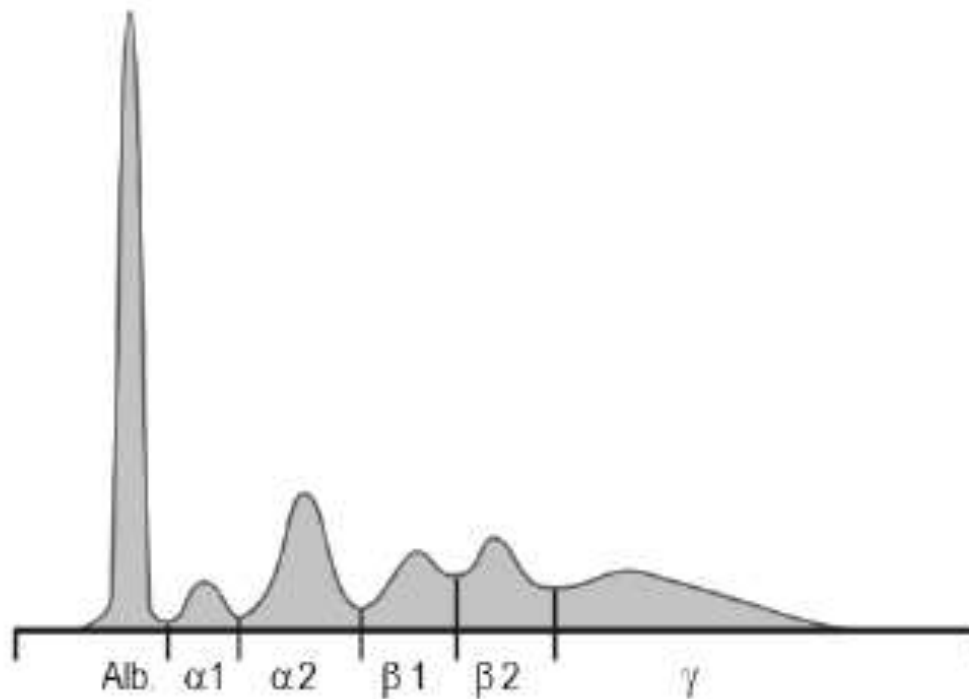
- a) Características eletroforéticas (mobilidade em campo elétrico)**
- b) Velocidade de difusão (coeficiente de Difusão)**
- c) Especificidade imunoquímica (estrutura e composição dos determinantes antigênicos das proteínas que foram separadas).**



Eletroforese de Proteínas do Soro Sanguíneo em Ágar ou Agarose: Princípios e Propriedades Gerais

PRINCIPAIS PROTEÍNAS ENCONTRADAS NAS BANDAS ELETROFORÉTICAS

A interpretação clínica da eletroforese é baseada nas variações das frações e na detecção de paraproteínas. Em um soro normal, utilizando técnica sensível como a eletroforese capilar, identifica-se seis bandas: albumina, alfa1, alfa2, beta1, beta2 e gama



Principais Resultados da Eletroforese de Proteínas Plasmáticas / Séricas

- **Albumina**: mais abundante no plasma, sendo sua função principal a manutenção da pressão coloidosmótica.
- **Gamaglobulina**: composta de imunoglobulinas do tipo IgG. As imunoglobulinas IgA, IgM, IgD e IgE se sobrepõem à junção Beta-Gama
- **Beta-globulinas**: esta zona é melhor avaliada de forma separada: Beta1 (transferrina, hemopexina) e Beta2 (Complemento C3)
- **Alfa1-globulinas**: Esta banda é principalmente composta por alfa1-antitripsina. O restante (10%) se deve à alfa1-glicoproteína ácida, alfa-fetoproteína e outras proteínas carreadoras
- **Alfa2-globulinas**: Inclui a Haptoglobina, Alfa2-macroglobulina e Ceruloplasmina

IMUNOELETROFORESE

- Pode-se fazer a comparação de misturas complexas de Ags que são separados em gel de ágar ou de agarose depositados sobre lâminas, após a aplicação da amostra em uma cavidade no gel e colocação dessa lâmina em uma cuba apropriada submetida a um campo elétrico.
- As moléculas presentes na mistura migram para os polos positivo ou negativo na dependência de sua cargas elétricas.
- Uma canaleta é recortada entre os poços e preenchida com um antissoro contendo Acs com especificidade para um ou mais Ags presentes na mistura a ser analisada e esses Acs se difundem até encontrar as moléculas de Ags e reagir com os mesmos.
- Os imunocomplexos Ags-Acs formam linhas ou arcos de precipitação.



Útil para detectar gamopatias monoclonais, como mieloma múltiplo e a macroglobulinemia

2.2. Material:-

- a) Solução de Bacto Ágar (Difco) ou de Agarose a 1% em tampão Tris-Acetato pH 8,2 e força iônica = 0,06;
- b) Lâminas de Microscopia;
- c) Pipetas de 5ml;
- d) Micropipetadores e ponteiras para 10ul e 50ul;
- e) Molde perfurador para imunoelektroforese;
- f) Bomba de vácuo aplicada com kitassato, cânulas e pipetas Pasteur;
- g) Placa de Preti com gaze umidecida e suportes para lâminas (Câmara úmida);
- h) Tampão tris-acetato pH 8,2 e força iônica de 0,113;
- i) Fonte e cuba para eletroforese;
- j) Antissoros anti-proteínas totais séricas de bovinos e de cobaias; k) Solução corante e descorante para imunoelektroforese;
- l) Tiras de papel de filtro;
- m) "Cotonete" com gaze;

2.3. Técnica

- a) Fundir o ágar em água fervente;
- b) Aplicar com um cotonete sobre a lâmina uma camada de ágar, esperar secar;
- c) Colocar, com pipeta, 2ml de ágar sobre as lâminas previamente revestidas com ágar e tomar cuidado para não formar bolhas nem deformidades, esperar esfriar e solidificar;
- d) Com o molde perfurador adequado, fazer os orifícios no gel e, em seguida, retirar os fragmentos de ágar com a trompa de vácuo; (figura 03)
- e) Cortar tiras de papel de filtro da largura da lâmina para fazer a ponte entre o tampão e as lâminas;
- f) Montar dentro da cuba, previamente preenchida com tampão, as lâminas, fazendo as pontes entre os polos de cuba com tiras de filtro;
- g) Aplicar em cada cavidade do ágar de 5 a 10ul da amostra a ser submetida à eletroforese;
- h) Fechar a cuba, ligar a fonte e regular a corrente para 6ml/lâmina, o que dá cerca de 50v/lâmina. Deixar a corrida prosseguir por 2h; (figura 04)
- i) Desligar a fonte e retirar as lâminas. Em seguida, remover, com o auxílio da tampa de vácuo, a canaleta de gel e adicionar dentro da canaleta o antissoro específico;
- j) Levar as lâminas, com cuidado, para a câmara úmida e fazer a leitura 24-48 horas depois;
- l) Levar as lâminas para lavar, secar, corar e descorar. (figura 05)

Fase I: Separação Eletroforética de Proteínas

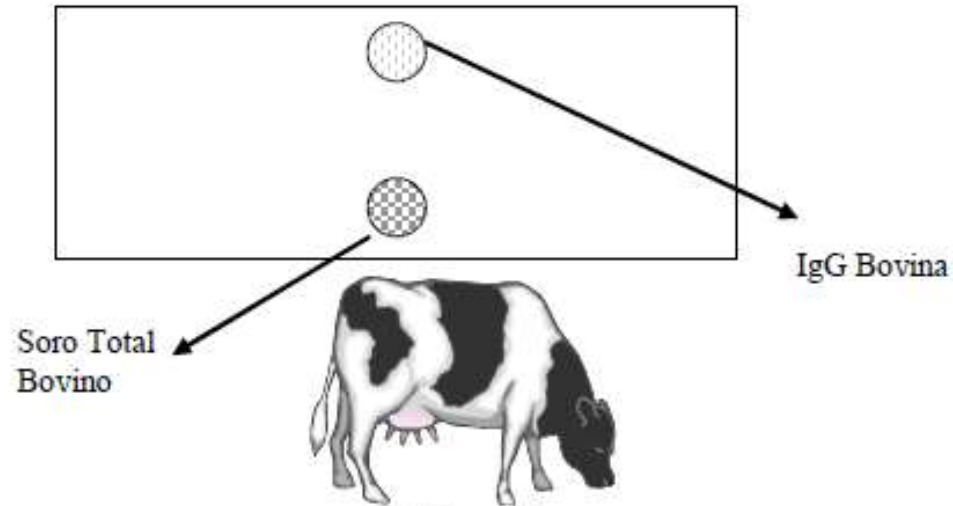
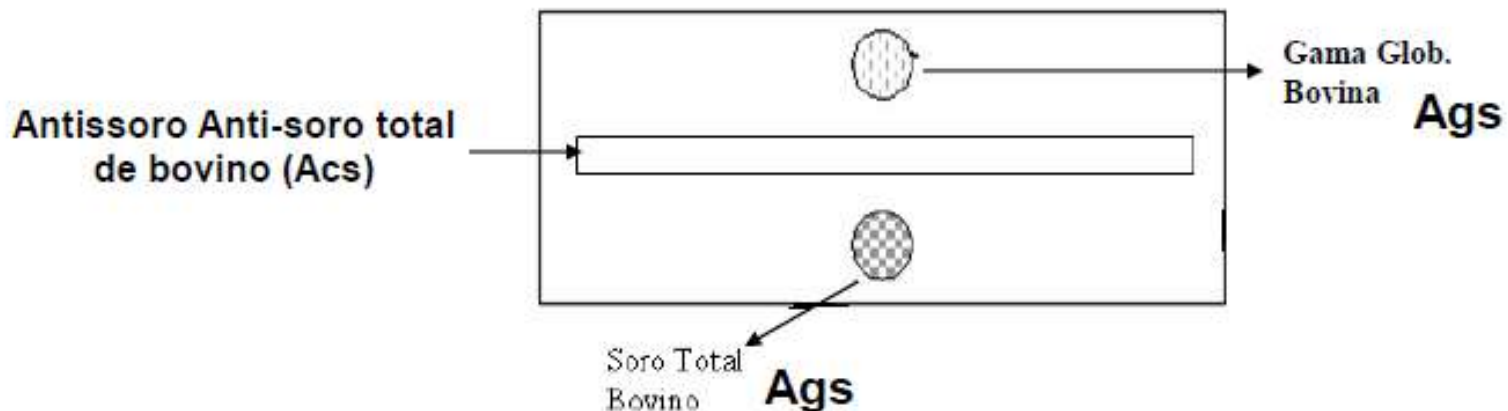
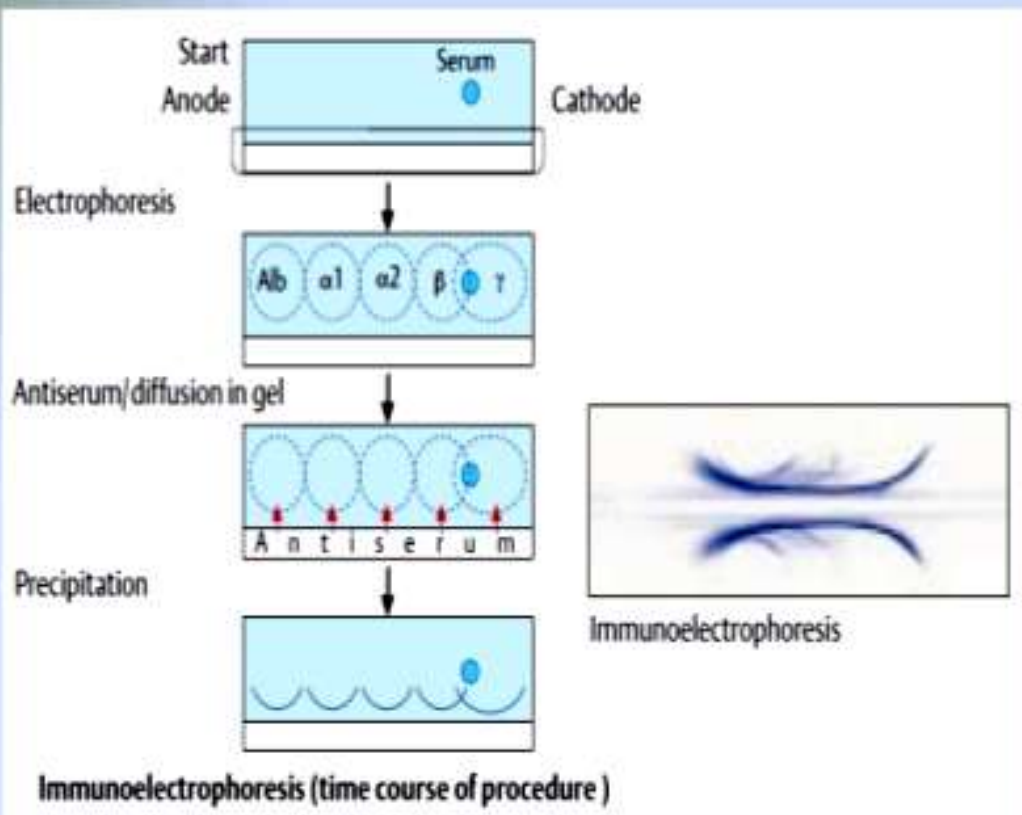


Figura 16

Fase II: Imunodifusão Ags (IgG / Gama Globulina / Soro Total Bovino)



IMUNOELETROFORESE

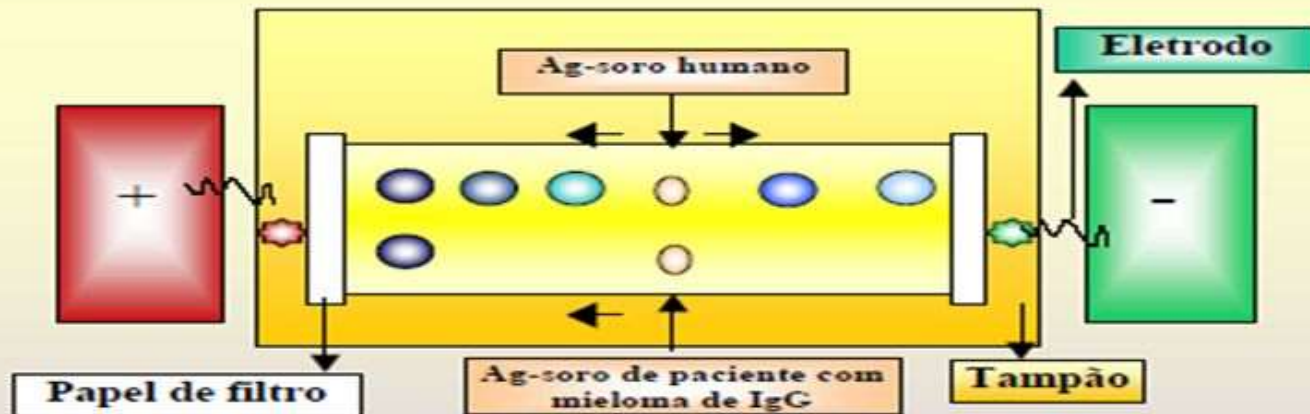


BURMESTER, G. R.; Pezzutto, A. Color Atlas of Immunology. Thieme, Germany, 2003.

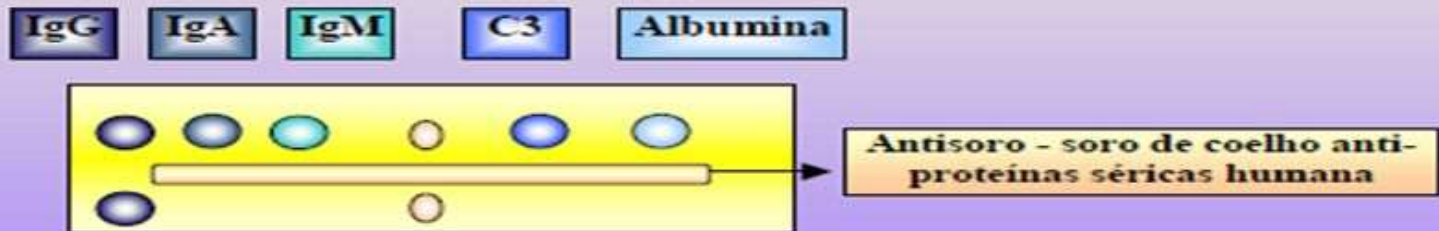
- 1) O gel é preparado e perfurado após sua solidificação,
- 2) O pH do gel é escolhido de forma que partículas negativas migrem para o eletrodo positivo,
- 3) É colocado o ac e/ou ag (a depender do tipo de imunoelectroforese) nos poços ou canaleta perfurados,
- 4) O gel numa cuba de electroforese horizontal,
- 5) É aplicada carga no gel, esta carga é a responsável pela migração de ag,
- 6) É cortada uma canaleta entre os poços, a qual será preenchida com ac,
- 7) Ac e ag formam arcos de precipitação no gel

IMUNOELETROFORESE

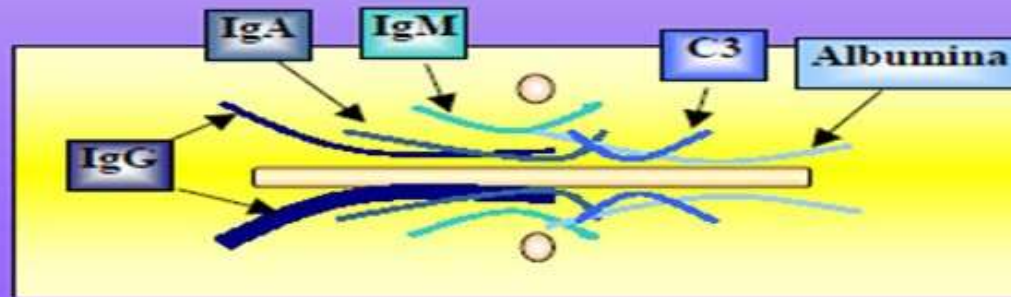
A.



B.



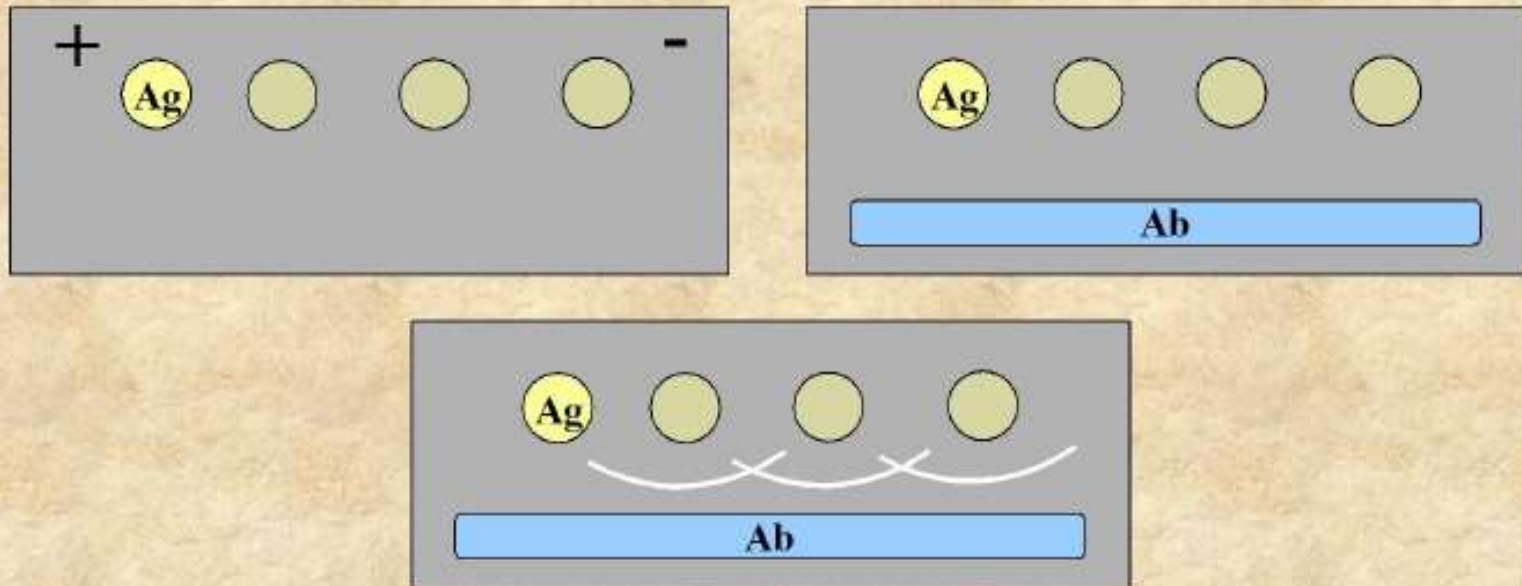
C.



Imunoeletroforese/Precipitação

- Método

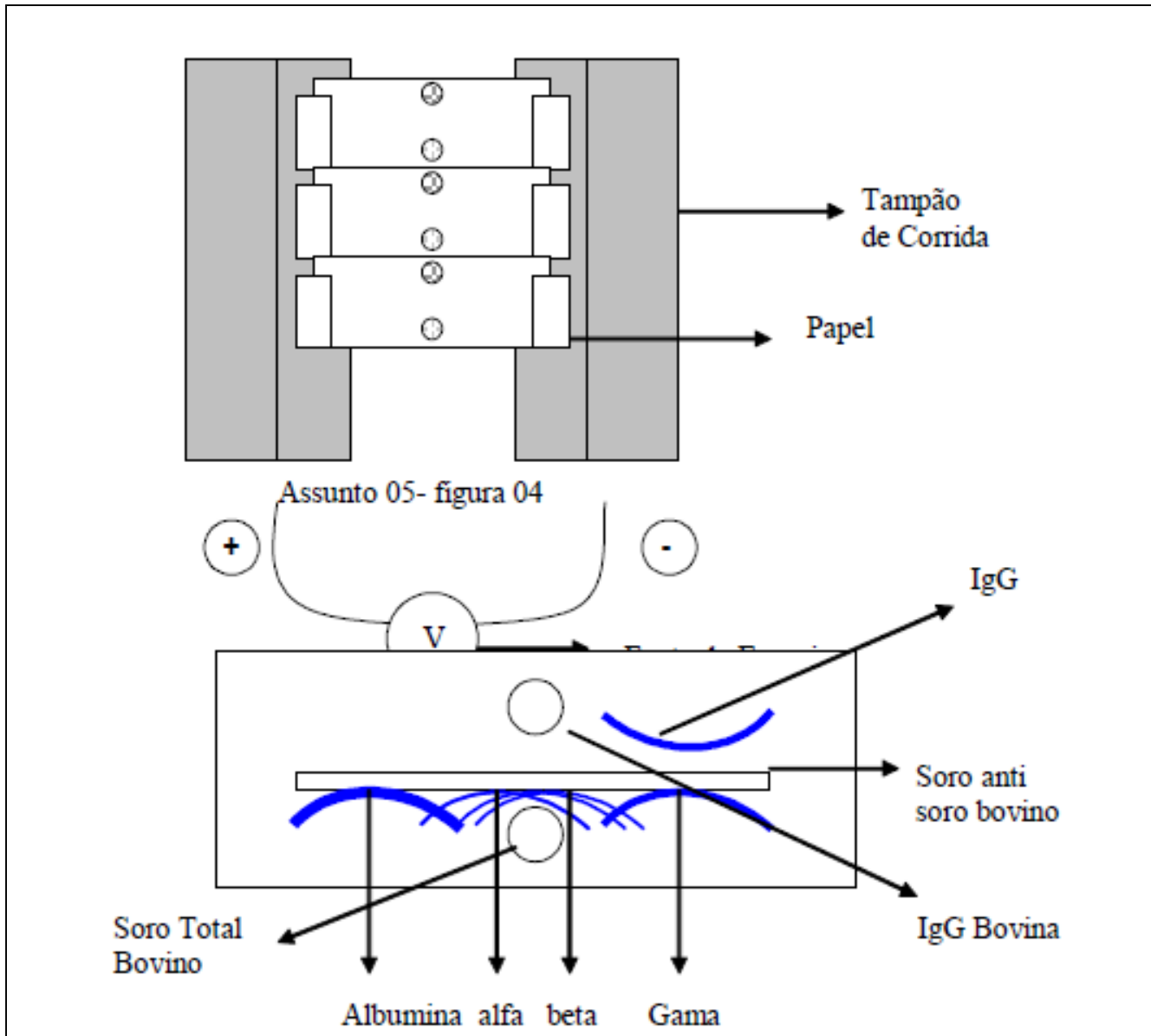
- Antígenos são separados por eletroforese
- Anticorpo é colocado num corte no ágar



- Interpretação

- Arco de precipitina representa a interação Ag-AC

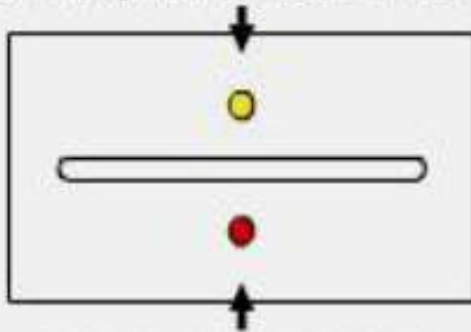
RESULTADOS – Leitura e Interpretação



Imunoeleetroforese/Precipitação

Serum samples are added to immunoelectrophoresis plate

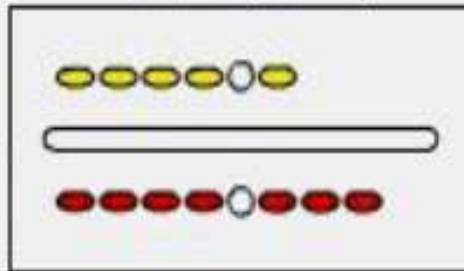
Serum from patient with recurrent infection



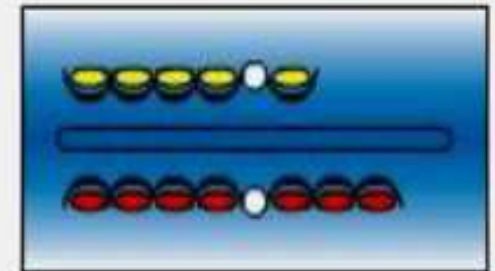
Serum from normal individual

Serum components are separated by electrophoresis

Albumin Globulins
 α β γ



Rabbit anti-human serum is added to the central trough and diffuses into the plate, forming precipitin lines



<https://www.youtube.com/watch?v=zUGikX9ZB9U>

<https://www.youtube.com/watch?v=w3NtwXOa2Ow>

<https://www.youtube.com/watch?v=yIFS1Ysv8RM>