



**CARACTERIZAÇÃO DAS FRAÇÕES
GAMA-GLOBULINA E IgG POR
IMUNOELETROFORESE**

Doutoranda Priscila Diniz Lopes

DEFINIÇÕES

- **Eletroforese** é um termo amplo que se refere à migração de todos os solutos ou partículas carregadas em um meio líquido sob a influência de um campo elétrico
- As **proteínas** possuem cargas positivas e negativas, sendo sua mobilidade eletroforética diretamente proporcional à carga da partícula e inversamente proporcional à viscosidade do meio

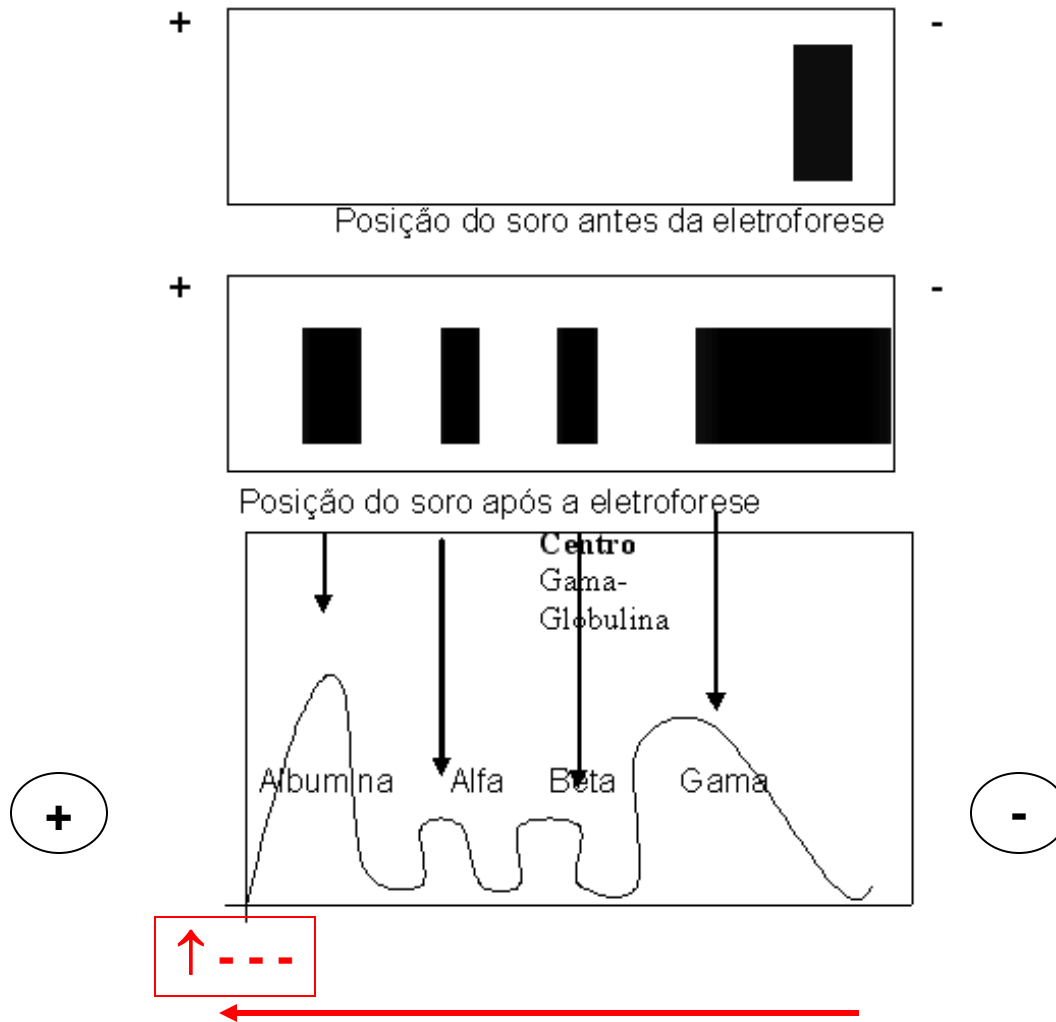


- A imunoeletroforese é uma técnica de imunoprecipitação em meio gelatinoso que combina a eletroforese com a imunodifusão radial
- Permite a discriminação de substâncias com base **na carga elétrica, peso molecular, tamanho, forma, concentração e propriedades antigênicas**
- O método original de Grabar e William (1953-54) é feito 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, este método permite a caracterização de uma substância simultaneamente por 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).



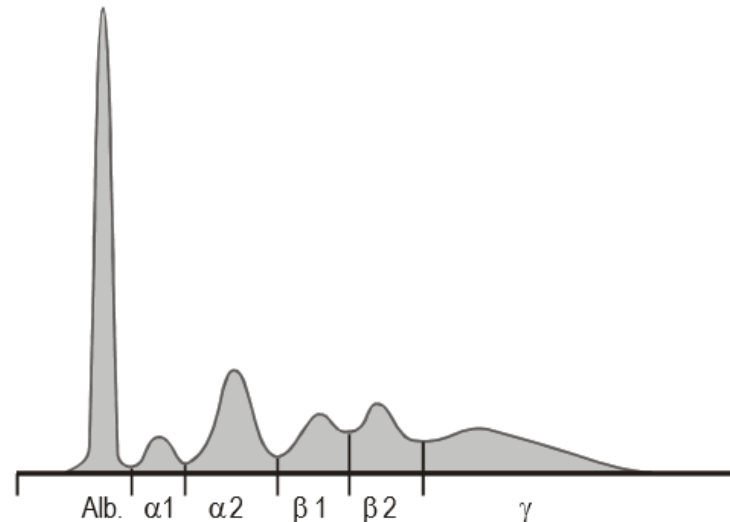


**Eletroforese de Proteínas do Soro Sanguíneo em Ágar ou Agarose:
Princípios e Propriedades Gerais**



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, α_1 , α_2 , β_1 , β_2 e gama



- 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 certas proteínas carreadoras
- Alfa2-globulinas: Inclui a Haptoglobina, Alfa2-macroglobulina e Ceruloplasmina



2.2. Material

- a) Solução de Bacto Ágar (Difco) 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) Tapão 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;
- k) Levar as lâminas para lavar, secar, corar e descorar. (figura 05)

Fase I: Separação Eletroforética de Proteínas

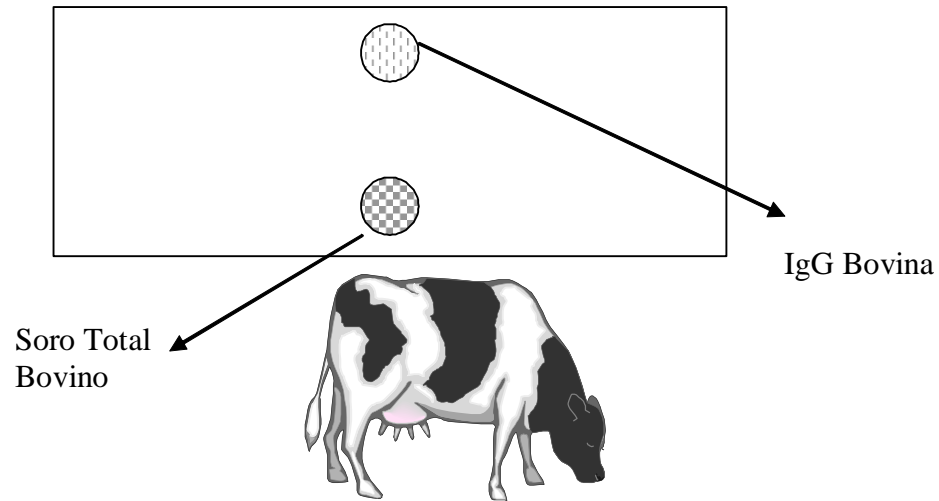
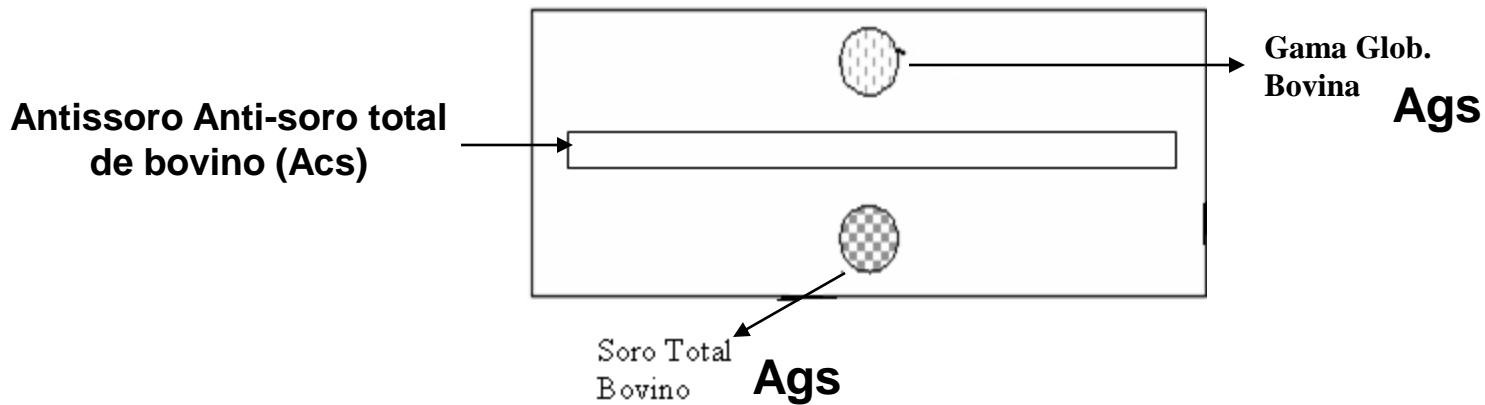


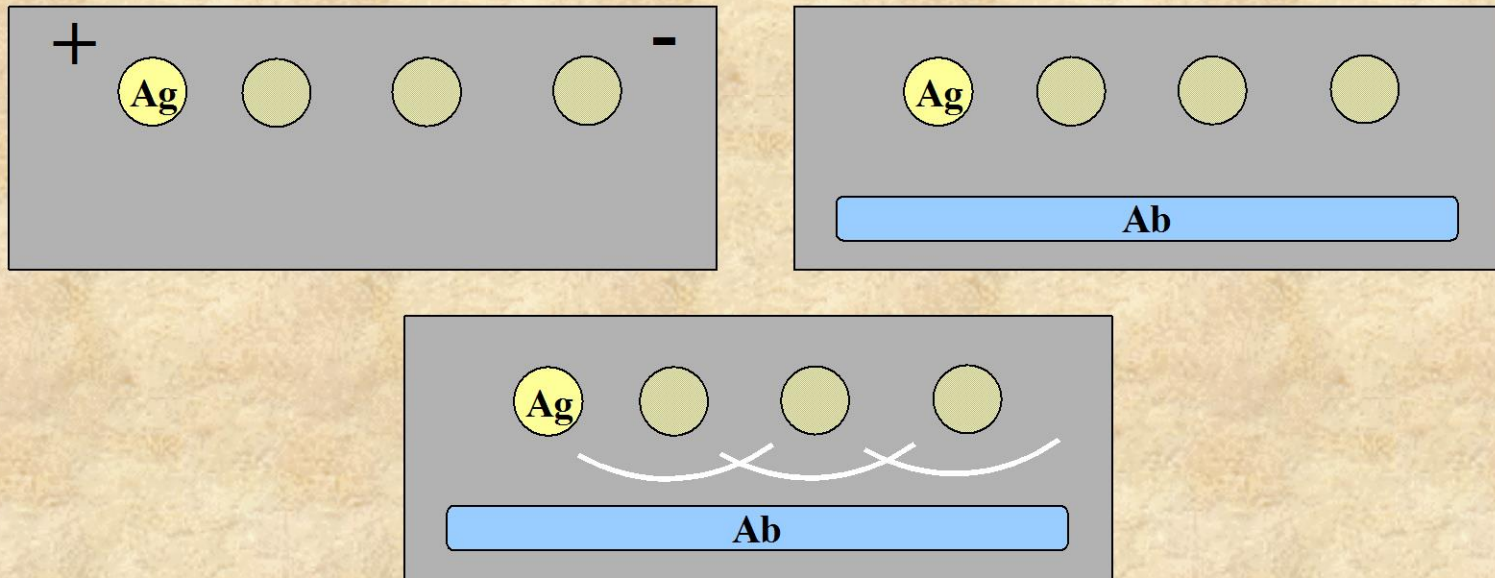
Figura 16

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



Imunoeletroforese/Precipitação

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

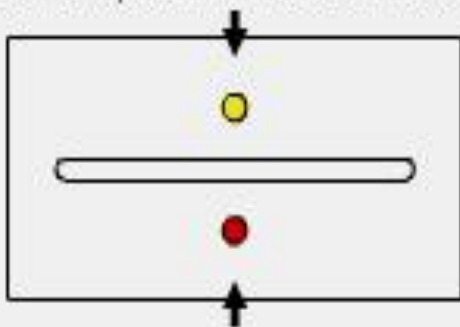


- Interpretação
 - Arco de precipitina representa a interação Ag-AC

Imunoeleetroforese/Precipitação

Serum samples are added to immunoelectrophoresis plate

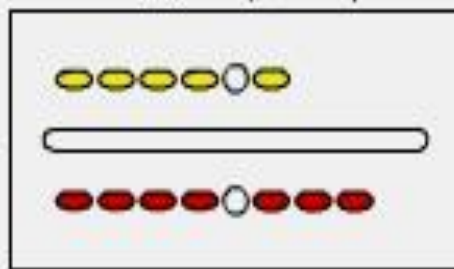
Serum from patient with recurrent infection



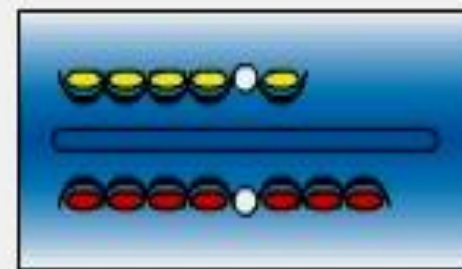
Serum from normal individual

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



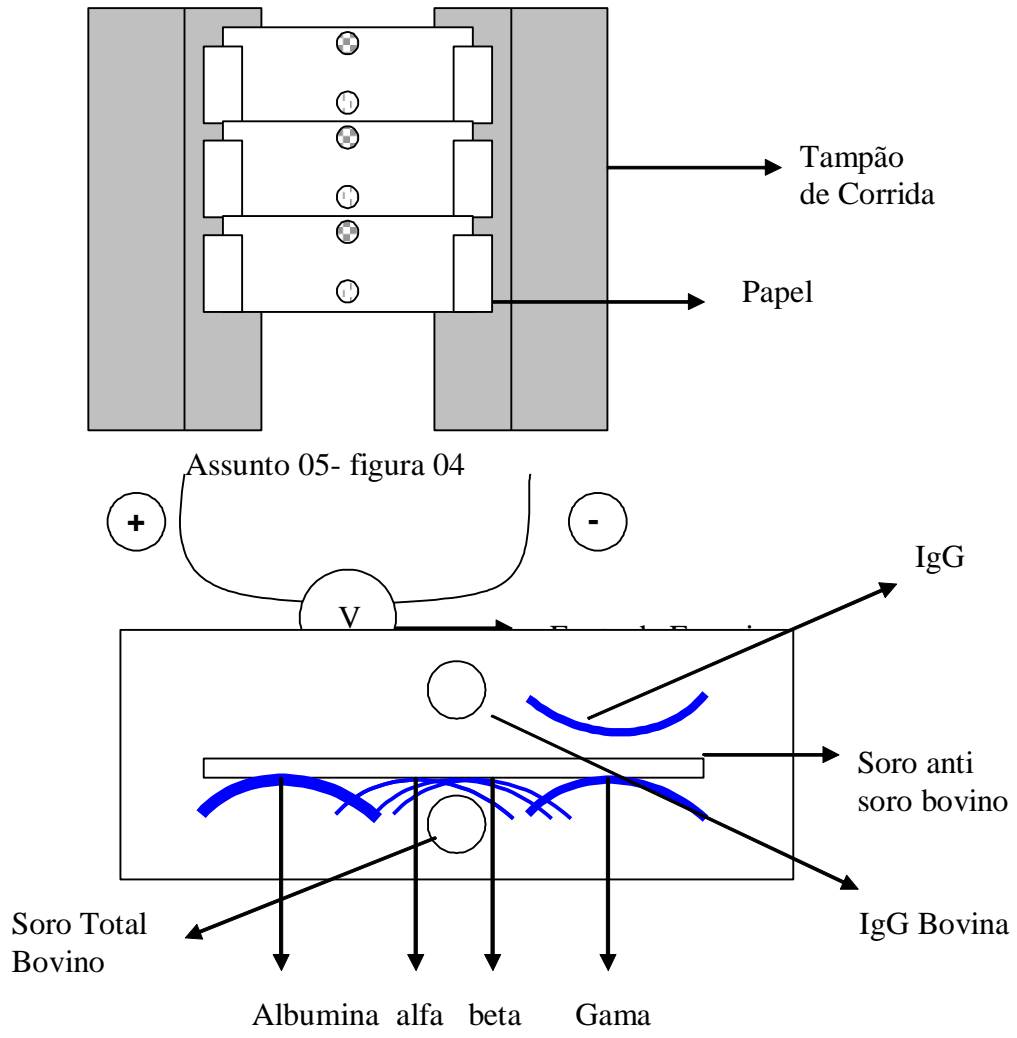


Figura 17

