

**Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
Ano Lectivo 2007/2008**

**Disciplina de BIOQUÍMICA I
Curso de MEDICINA
1º Ano**

ENSINO PRÁTICO E TEORICO-PRÁTICO

7ª AULA PRÁTICA

Electroforese de proteínas plasmáticas

- Interpretação do proteinograma -

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A electroforese é a designação genérica de um método que tem como objectivo a separação e identificação dos constituintes de uma fase sólida com carga, em suspensão numa fase líquida tamponada, quando se lhe aplica um campo eléctrico contínuo.

Princípio fundamental

As partículas carregadas electricamente deslocam-se num campo eléctrico para o eléctrodo de sinal contrário; iões positivos (catiões) para o cátodo e iões negativos (aniões) para o ânodo.

Os aminoácidos, os peptídeos ou as proteínas apresentam carácter anfotérico devido à coexistência, em cada molécula, de funções ácidas (-COOH) e básicas (-NH₂). Assim, as substâncias anfotéricas, em meio ácido, comportam-se como bases fracas, captando iões H⁺, e, em meio alcalino, pelo contrário, actuam como ácidos fracos, libertando protões.

Raramente os grupos -NH₂ e -COOH existem em número igual na forma livre. Neste caso, é ainda mais raro que estes grupos funcionais sejam ionizados igualmente [pK (COOH) = 2,4 e pK (NH₂) = 9-12]. Assim, cada molécula anfotérica possui o seu ponto isoeléctrico característico. O ponto isoeléctrico é o pH em que uma substância não se desloca sob a influência do campo eléctrico, ou seja, é electricamente neutra, (tendo o mesmo número de cargas positivas e negativas).

As propriedades do meio líquido são essenciais na separação electroforética: o pH, a força iónica, a viscosidade, a constante dieléctrica, a temperatura, conjugam as suas acções para conferir à espécie molecular que se pretende separar, a mobilidade electroforética dependente do campo eléctrico do meio tamponado.

A carga eléctrica das proteínas do soro depende do pH do meio. Se o pH é superior ao ponto isoeléctrico, a proteína fica com carga negativa e migra para o ânodo, mas se o pH é inferior ao ponto isoeléctrico, a proteína é carregada positivamente e migra para o cátodo. A velocidade de migração das proteínas na electroforese é directamente proporcional à sua carga eléctrica e inversamente proporcional ao seu peso molecular. A deslocação das partículas é ainda influenciada pela força iónica do meio (número de iões do meio) e pela temperatura. Deste modo, numa electroforese mantêm-se constantes o pH e a força iónica do meio, através de uma solução tampão.

MODALIDADES DE ELECTROFORESE

- 1) Electroforese livre (de Tiselius), realizada em meio líquido
- 2) Electroforese de zona ou de suporte, realizada sobre diversos materiais de suporte:
 - a) Papel de filtro
 - b) Agarose
 - c) Acetato de celulose
 - d) Gel de amido
 - e) Poliacrilamida

Electroforese de zona

Na electroforese de zona, utilizada em bioquímica clínica, a fase aquosa é estabilizada sobre um suporte poroso impregnado de solução tampão condutora. A maior aplicação deste processo diz respeito ao fraccionamento das proteínas e lipoproteínas séricas e acessoriamente às urinárias e raquidianas.

A electroforese inclui 3 fases:

- 1ª fase-** electroforese propriamente dita, em que há separação das diferentes fracções proteicas.
- 2ª fase-** revelação (coloração e lavagem dos meios de suporte)
- 3ª fase-** leitura (avaliação quantitativa das diversas fracções).

Quando colocamos as proteínas do soro num campo eléctrico com meio a pH 8,6 (tampão veronal ou de Michaelis), elas comportam-se como aniões e deslocam-se portanto para o pólo positivo (pI albumina= 4,5; pI γ -globulina \approx 7,5).

Podemos, em seguida, revelar a electroforese, utilizando corantes específicos, conforme queremos evidenciar:

- a) Apenas as **cadeias peptídicas** – usa-se um corante específico, por exemplo, o amido-schwartz (negro de amido), e obtemos um **proteinograma**;

b) As **fracções glucosídicas** das glicoproteínas – usa-se um corante para glúcidos, por exemplo, o Mac. Manus (reagente de Schiff) e obtemos um glucidograma (**glicoproteinograma**);

c) As **estruturas lipídicas das lipoproteínas** – usa-se um corante para lipídios, por exemplo, o negro de Sudão, e obtemos um lipidograma (**lipoproteinograma**).

PROTEINOGRAMA ELECTROFORÉTICO – Aplicabilidade clínica

Num proteinograma, observam-se 5 zonas de migração, ou bandas, em que a mais aniónica corresponde à albumina (menor peso molecular e maior carga eléctrica negativa) e as seguintes, respectivamente, às globulinas α_1 , α_2 , β e γ . Os valores normais destas fracções proteicas no soro (em %) são:

Albumina		57,1 - 74,3 %
Globulina	α_1	2,9 - 5,7 %
"	α_2	5,7 - 10,0 %
"	β	10,0 - 12,9 %
"	γ	10,0 - 20,0 %

A Albumina é a proteína plasmática que existe em maior quantidade e tem funções importantes como a regulação da pressão oncótica e o transporte de moléculas.

Das α_1 globulinas fazem parte, entre outras, proteínas importantes da fase aguda da inflamação como é o caso da α_1 antitripsina.

Do grupo das α_2 globulinas fazem parte proteínas como a haptoglobina, a α_2 macroglobulina e a ceruloplasmina.

A transferrina e o fibrinogénio são exemplos de proteínas plasmáticas que migram na banda das β globulinas.

Das γ globulinas fazem parte as proteínas responsáveis pela resposta imune (imunoglobulinas, IgG, IgA, IgM, IgD, IgE).

O proteinograma electroforético é solicitado na prática clínica como auxílio diagnóstico, permitindo avaliar o estado funcional do indivíduo.

Estão descritos perfis electroforéticos “típicos” de determinadas situações clínicas.

No caso de tumores produtores de plasmócitos (plasmocitomas) este tipo de estudo permite identificar o tipo de proteína que é segregada pelas células tumorais.

Muitas doenças neoplásicas, metabólicas e infecciosas estão associadas a um distúrbio não específico das proteínas séricas, caracterizado por hipoalbuminémia e aumento da concentração de α -globulina.

A análise electroforética das proteínas do líquido céfalo-raquídeo é um exame laboratorial útil no diagnóstico de várias doenças neurológicas. Pode dar indicação de alteração da integridade da Barreira Hemato-Encefálica e ainda do funcionamento celular do Sistema Nervoso Central, nomeadamente se existe ou não síntese intratecal de proteínas, como por exemplo, de Ig G, na esclerose múltipla.

DESCRIÇÃO DA TÉCNICA

1) Depósito da amostra (soro, LCR, urina) **sobre a linha de partida:** Deposita-se a amostra num ponto do suporte e faz-se passar uma corrente contínua através deste. A "natureza do suporte" é variável, em função da separação que se pretende efectuar. Na maior parte das vezes procura-se a separação das cinco grandes famílias proteicas do soro sanguíneo, utilizando-se então como suporte o acetato de celulose.

2) Migração electroforética: As proteínas migram em função da carga e dos factores atrás referidos parando em diferentes zonas, obtendo-se uma separação na forma de "bandas". A designada "mobilidade electroforética" exprime a velocidade de migração das partículas e, conseqüentemente, a distância de migração relativamente ao ponto de aplicação em função do campo eléctrico. A superfície carregada da partícula, em contacto com o meio líquido tamponado, rodeia-se de uma camada de iões cuja concentração e mobilidade variam em relação com numerosos factores, nomeadamente, a ionização variável dos grupos carboxilo e amina das proteínas.

3) Fixação e coloração das fracções proteicas.

4) Integração das bandas coloridas - obtenção do perfil electroforético por leitura num densitómetro a determinado comprimento de onda. A cada banda corresponde um pico cuja altura é proporcional à intensidade da coloração e cujo integral da superfície é proporcional à quantidade relativa de proteínas. Assim, num soro normal desenha-se um perfil electroforético com cinco picos, correspondentes a cada uma das fracções proteicas: albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β -globulina e γ -globulina.

5) Expressão dos resultados - os resultados de uma electroforese devem ser sempre acompanhados do teor de proteínas totais do fluido biológico estudado. Assim, será possível exprimir por cada banda colorida e pela superfície abrangida por cada pico, o coeficiente de repartição em relação ao conjunto, facto que permite o cálculo de cada fracção em g/l, conhecendo o teor de proteínas totais.

Tabela I - VALORES NORMAIS* DAS PROTEÍNAS DO SORO PLASMÁTICO E SUAS PROPORÇÕES

	Média (g/dl)	Limites (g/dl)	Ns	Média (%)	Limites Ns (%)
ALBUMINA	4,5	4,0 - 5,2		64,3	57,1 – 74,3
GLOBULINAS	2,5	1,9 - 2,7		35,7	27,1 – 38,6
GLOB. α	0,79	0,6 - 0,9		11,3	8,6 – 12,9
GLOB. α_1	0,31	0,2 - 0,4		4,4	2,9 – 5,7
GLOB. α_2	0,48	0,4 - 0,7		6,9	5,7 – 10,0
GLOB. β	0,81	0,7 - 0,9		11,6	10,0 – 12,9
GLOB. γ	0,90	0,7 - 1,4		12,9	10,0 – 20,0
TOTAL	7,0	6,0 – 8,0		_____	_____
ALB/GLOB	1,8	1,4 - 2,7		_____	_____

*OS VALORES NORMAIS PODEM VARIAR CONSOANTE O LABORATÓRIO QUE REALIZA A ANÁLISE

Nas globulinas γ , individualizaram-se imunologicamente diversos tipos, que se designam, actualmente, como sistema das globulinas γ , ou simplesmente, sistema das imunoglobulinas: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Aplicações Clínicas da Electroforese

Todos os fluídos biológicos contêm uma mistura heterogénea de proteínas. A electroforese tem sido aplicada ao estudo de proteínas séricas, proteínas da urina, proteínas do líquido céfalo-raquídeo, lipoproteínas e glicoproteínas séricas.

A análise electroforética das proteínas séricas ou **proteinograma electroforético** é um exame frequentemente requisitado na prática clínica diária, devido ao seu valor no auxílio do diagnóstico de variadas doenças. O aspecto global do perfil electroforético é por vezes suficiente para referenciar de imediato algumas anomalias proteicas características de diferentes entidades nosológicas.

A electroforese desempenha um papel importante, por exemplo, no diagnóstico de mieloma múltiplo, macroglobulinémia, enteropatia exudativa, síndrome nefrótica, cirrose, sarcoidose e variadas doenças do colagénio. Muitas doenças neoplásicas, metabólicas e infecciosas estão associadas a um distúrbio não específico das proteínas séricas, caracterizado por hipoalbuminémia e aumento da concentração de α -globulina. Por exemplo, o proteinograma sérico na cirrose hepática apresenta alterações úteis para o diagnóstico (Fig. 1). A par com uma diminuição da síntese hepática da albumina, há, em simultâneo, uma subida nas proteínas que migram nas fracções β e γ (o característico “planalto β - γ ”) por diminuição da catabolização das globulinas no fígado cuja função está deficiente (insuficiência hepática). No caso do síndrome nefrótico, há perda de proteínas pelo rim, sede inicial desta doença. Simultaneamente, dá-se a produção de proteínas inflamatórias, que migram normalmente na fracção α_2 -globulina e que originam um pico no proteinograma.

A análise electroforética das proteínas do líquido céfalo-raquídeo é um exame laboratorial útil no diagnóstico de várias doenças neurológicas. Pode dar indicação de alteração da integridade da Barreira Hemato-Encefálica e ainda do funcionamento celular do Sistema Nervoso Central, nomeadamente se existe ou não síntese intratecal de proteínas, como por exemplo, de Ig G, na esclerose múltipla.

Quase todas as proteínas do liquor provêm do soro. Exceptuam-se a β , a γ (gama) e a τ (Tau) globulinas, a proteína básica da mielina e a proteína fibrilar glial que são de síntese intratecal. Entram por pinocitose através dos endotélios capilares e a velocidade de entrada depende do ponto isoeléctrico das proteínas.

Segundo **Thompson (1988)** o proteinograma electroforético do líquido pode apresentar os seguintes padrões:

1 – Padrão de aumento de entrada das proteínas plasmáticas:

Resulta num aumento das proteínas totais no LCR e o padrão electroforético fica semelhante ao do plasma.

Como as proteínas totais atingem níveis muito altos, a pré albumina e a tau tornam-se menos proeminentes (diluem-se). As proteínas plasmáticas de alto peso molecular aumentam (IgM, β_1 e α_2).

Ex: - Alterações da barreira por aumento da permeabilidade das células endoteliais;
- Alterações na reabsorção por obstrução no espaço subaracnoideu.

2 – Padrão secundário a alterações nas proteínas plasmáticas:

As alterações detectadas no proteinograma sérico aparecem também no perfil do líquido. Ex: Disproteinémias – Gamopatias monoclonais – Mieloma múltiplo.

3 – Padrão de produção intratecal de imunoglobulinas:

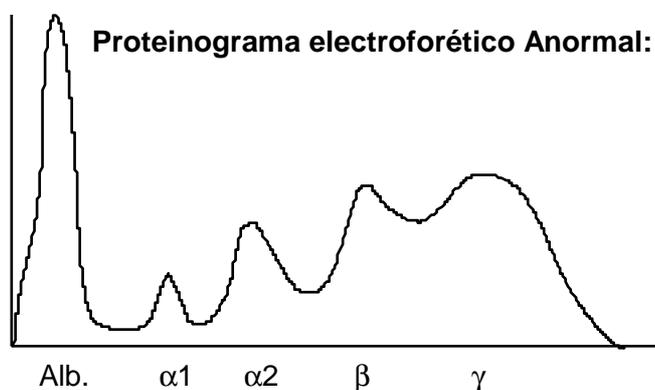
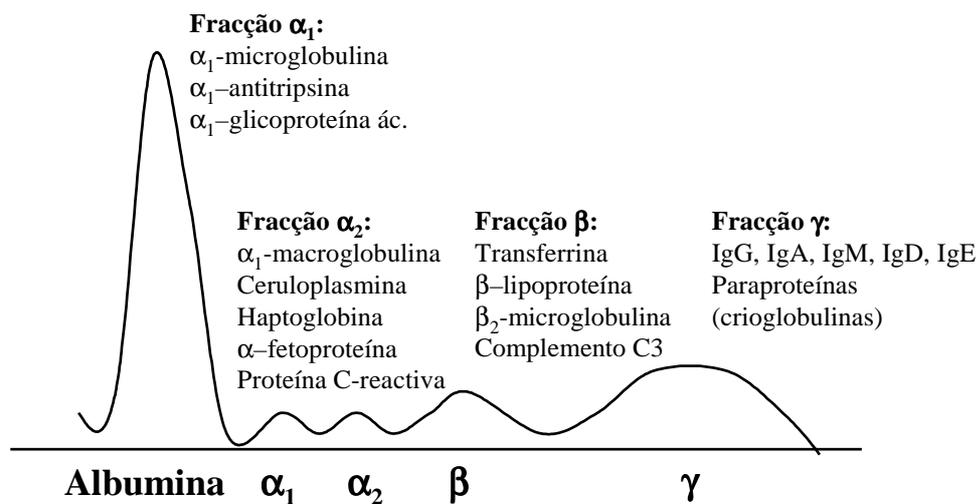
Nalgumas doenças o líquido apresenta aumento da gama-globulina (particularmente IgG) enquanto os níveis plasmáticos são normais. Nestes casos há evidência de que foram sintetizados no LCR.

Ex: Esclerose múltipla;
Panencefalite esclerosante subaguda (doença pós-sarampo)

4 – Padrão degenerativo:

Num grupo muito heterogéneo de doenças neurológicas (doença vascular, Alzheimer, etc) têm-se encontrado alterações na concentração de β_1 , globulinas e fracção tau. No entanto, dada a heterogeneidade das patologias, estas alterações são pouco específicas.

Proteinograma electroforético Normal:



	FRACÇÃO (%)	g/dl	Valores Referência
Albumina	36,6	3,4	4,0 - 5,2
α_1	3,1	0,9	0,2 - 0,4
α_2	10,9	1,0	0,4 - 0,7
β	18,6	1,7	0,7 - 0,9
γ	30,8	2,8	0,7 - 1,4
Total		9,8	6,0 - 8,0
A/G		0,58	1,4 - 2,7

Fig. 1- Perfil electroforético das proteínas do soro sanguíneo de um doente com **cirrose hepática** (diminuição da albumina, aumento das gamaglobulinas, planalto beta-gama). Em baixo está representado o gel respectivo.

Ano Lectivo 2007/2008

BIOQUÍMICA I
1º Ano

PROTOCOLO DE BANCADA - 7ª AULA PRÁTICA

ELECTROFORESE DAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

- Marcar as tiras de acetato e mergulhá-las lenta e cuidadosamente em tampão deixando embeber pelo menos durante 2 horas ou, de preferência, de um dia para o outro no frigorífico.
- Deitar 500 ml de tampão frio em cada um dos compartimentos da tina e ligá-la durante 15 minutos a 200 V para estabilizar.
- Encher os poços do porta-amostras com os soros ou plasmas a analisar.
- Retirar as tiras do tampão, enxugá-las entre 2 folhas de papel de filtro e colocá-las nas pontes respectivas.
- Mergulhar os aplicadores nas amostras e fazer uma aplicação prévia sobre papel de filtro para verificar o bom funcionamento do aplicador.
- Mergulhar de novo nas amostras e aplicar sobre o acetato deixando permanecer durante \pm 10 segundos.
- Abrir a tina, introduzir as pontes com as tiras, fechar, verificar de novo a voltagem (200 V) e deixar correr durante 50 minutos.
- Retirar as tiras de electroforese, cortar as pontas do acetato e corar em Ponceau S a 0,5 % (em TCA a 5 %) durante 6 minutos.
- Lavar em 2 banhos sucessivos de ácido acético a 5 % até o acetato ficar branco.
- Desidratar em Metanol cerca de 4 minutos.
- Retirar do Metanol, deixar ao ar uns segundos e colocar em solução diafanizadora durante 5 minutos.
- Escorrer as tiras e aplicá-las sobre lâminas de vidro cuidadosamente lavadas com álcool e secas.
- Secar em placa térmica ou estufa a 50-60 °C durante \pm 10 minutos.
- As tiras são lidas em densitómetro a 525 nm.