

TÉCNICAS DE LABORATÓRIO

ELETROFORESE EM PAPEL DAS PROTEÍNAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO. III. TÉCNICA

A. SPINA-FRANÇA *

A eletroforese em papel (EFP) tem-se mostrado método bastante útil para o estudo das frações protéicas de líquidos biológicos. Em publicação anterior³ foram revistos tanto os aspectos gerais do método e seus limites de segurança, como os caracteres principais das frações protéicas do líquido cefalorraquidiano (LCR). Ulteriormente, numa segunda revisão⁴, foram analisadas algumas das contribuições diretamente relacionadas com o comportamento das frações protéicas do LCR em condições normais e patológicas. Os resultados apontados nessas publicações demonstram a utilidade do método para a obtenção de dados práticos aplicáveis ao diagnóstico e ao controle da evolução em grande número de afecções neurológicas e, ainda, para o estudo da fisiopatologia do LCR.

Embora ainda sejam discutidos muitos detalhes técnicos referentes à EFP, a homogeneidade existente entre os dados registrados para afecções semelhantes, mostra que esses detalhes não influem de maneira sensível nos resultados. Entretanto, a eletroforese em papel é ainda um método bastante novo e sua utilização na prática diária exige escolha entre as diversas variantes de técnica descritas, devendo cada pesquisador referir a técnica empregada em seus trabalhos.

A finalidade desta publicação é apresentar a técnica da eletroforese em papel das proteínas do LCR, empregada no laboratório da Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo indicando, entre as diversas variantes, aquelas que têm sido adotadas, por se mostrarem mais práticas, segundo experiência de cerca de dois anos.

* Assistente extranumerário da Clínica Neurológica (Serviço do Prof. Adherbal Tolosa) e médico auxiliar de ensino no Laboratório Central (Serviço do Dr. Octavio A. Germeck) do Hospital das Clínicas da Fac. Med. da Univ. de São Paulo.

Nota do autor — A técnica utilizada segue os ensinamentos do orientador dos estudos sobre a eletroforese em papel no nosso meio — Dr. Günther Hoxter — que muito tem contribuído para a elucidação de pontos obscuros da técnica e da interpretação dos resultados e a quem expressamos nosso agradecimento.

Para facilitar a sistematização, a técnica utilizada para a EFP das proteínas do LCR será considerada nas fases sucessivas do processo. No final serão apresentados os aspectos especiais da EFP das proteínas do soro sanguíneo, atendendo ao caráter prático que apresenta também este exame para a Neurologia, especialmente quanto ao estudo comparativo com LCR patológicos.

Preparo do líquido cefalorraquidiano — A amostra de LCR a ser examinada é centrifugada (20 minutos a 2.000 rotações por minuto) para afastar os elementos figurados; o material não deve conter sangue (hemorragia acidental). Após centrifugação a amostra é colocada em geladeira até a utilização, o que deve ocorrer dentro de, no máximo, uma semana. Após determinar a proteinorraquia total, o restante da amostra é concentrado, visando reduzir o volume líquido até um mínimo utilizável para a EFP (não maior que 0,04 ml, contendo aproximadamente 0,5 mg de proteínas totais).

Para a *concentração* temos utilizado tanto a diálise contra solução de substância macro-molecular, como a precipitação pela acetona gelada.

Para o primeiro processo utiliza-se a polivinilpirrolidona (P.V.P.) a 20% em solução tampão, na qual é mergulhada a amostra em estudo, contida em saco de celofane. Em geral, em cerca de 24 horas é obtida concentração satisfatória. Para diminuir o risco de contaminação e de deterioração, a concentração é feita em geladeira.

Para o segundo processo adotamos a técnica de Roboz e col.², sendo as proteínas precipitadas com acetona gelada (duas partes de acetona para uma de LCR) sendo juntada pequena quantidade de Verseno para laquear os ions inorgânicos; quando não se pode contar com este preparado a precipitação pela acetona é precedida por diálise contra água destilada para diminuir o teor desses ions. Após permanência em geladeira durante 12 horas, a mistura é centrifugada para a separação das proteínas, utilizando-se tubos previamente refrigerados. O resíduo protéico obtido é conservado em geladeira por algumas horas para que se evapore o restante da acetona; no final, esse resíduo é rediluído com uma gota de solução tampão.

Conhecidos os volumes inicial e final e o conteúdo protéico total da amostra, calcula-se o volume que contenha 0,5 mg de proteínas totais, volume este a ser utilizado para a eletroforese.

Quando a concentração é feita pelo método da diálise torna-se difícil calcular o volume final, especialmente quando este for muito reduzido. Nesta última circunstância pode-se recolher o material por embebição: uma tira do mesmo papel de filtro a ser utilizado na eletroforese, medindo 30 mm x 3 mm aproximadamente, é colocada no interior do saco de celofane, para embeber o líquido residual; essa pequena tira, que deve ser manejada com pinça, será depois sobreposta à tira que servirá de suporte para a eletroforese.

Se a concentração pela diálise determinar a remoção praticamente total do líquido, o resíduo — que contém a proteína — deve ser rediluído com uma gota de solução tampão, para que seja possível a embebição a que referimos.

Eletroforese — Para a separação eletroforética das frações protéicas temos empregado, como suporte, tiras de papel de filtro Whatman nº 1 ou Schleicher-Schuell 2043-a, medindo 4 x 30 cm. Uma linha perpendicular ao comprimento da tira é traçada a lápis na face lisa, a 9 cm de uma das extremidades; a seguir, a tira é umedecida com solução tampão e colocada sobre porções de papel de filtro comum, durante 10 minutos, para remover o excesso dessa solução. Após este tempo, ela está pronta para ser colocada no aparelho de eletroforese.

Empregamos dois aparelhos de eletroforese do tipo Grassmann, fabricados, respectivamente, por A. H. Thomas Co. (Filadélfia, U.S.A.) e por J. Perini (São Paulo). A tira de papel de filtro umedecida é estendida horizontalmente sobre a estante do aparelho que a mantém suspensa entre duas cubas, no interior das quais suas extremidades mergulham na solução tampão de Barbitol, com pH entre 8,6 e 8,8 e força iônica de 0,1. As cubas são ligadas aos polos de corrente elétrica contínua; a extremidade do papel de filtro próxima da linha traçada a lápis é mergulhada na cuba onde se acha o polo negativo.

O material concentrado é distribuído com micropipeta ao longo da linha traçada a lápis na tira de papel, cerca de 10 minutos depois que o papel de filtro foi colocado no aparelho. Quando o volume de LCR concentrado for maior que 0,02 ml, sobre a marca a lápis deve ser colocada pequena tira do mesmo papel de filtro (30 mm x 3 mm aproximadamente) na qual se faz a distribuição; este detalhe permite a formação de frente de migração mais uniforme e evita que a pipeta possa arranhar a tira de papel de filtro.

A seguir, é ligada a corrente elétrica, estabilizando-se a voltagem entre 110 a 120 volts. A passagem da corrente é mantida durante 14 horas, no mínimo; após sua interrupção a estante é removida do aparelho e posta a secar em estufa a 35°C, juntamente com as tiras de papel de filtro cujas extremidades são seccionadas por se apresentarem bastante embebidas de solução tampão.

Coloração e fotometria — Uma vez secas, as tiras de papel são imersas em solução metilica saturada de Amido-Schwarz 10-B por 10 minutos. Em seguida, para a retirada do excesso de corante, as tiras são submetidas a passagens em diversas cubas, sucessivamente, contendo as 3 primeiras e a última a solução descorante A (9 partes de metanol e uma parte de ácido acético glacial) e, as demais, solução descorante B (40 g de fenol, 100 g de ácido acético glacial e água destilada q. s. para um litro). O processo é interrompido apenas quando as partes do papel onde não haja frações protéicas se apresentarem bem claras, trocando-se para isso a segunda solução tantas vezes quantas forem necessárias. Secagem em temperatura ambiente.

Coradas e secas, as tiras de papel de filtro permanecem em uma solução diafanizante por um dia, para se tornarem transparentes. Após isto,

procede-se à fotometria direta em densitômetro tipo Grassmann e Hannig, fabricado por J. Perini (São Paulo), no qual a intensidade da luz transmitida através do papel é captada por célula fotoelétrica e registrada por galvanômetro, em valores correspondentes à densidade óptica $\times 10$.

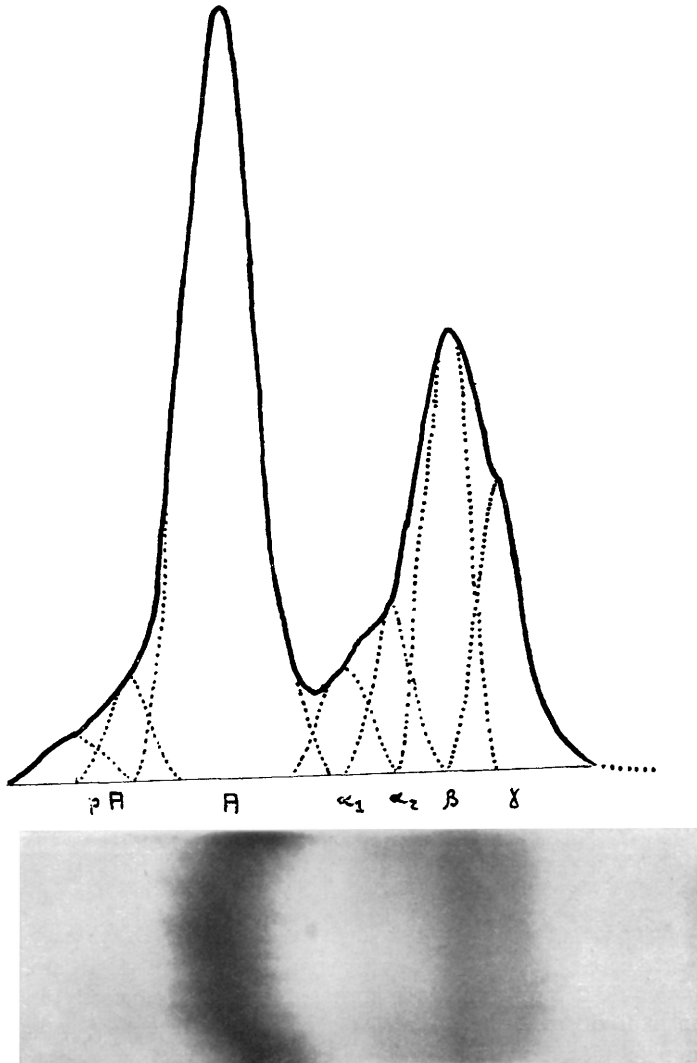


Fig. 1 — Traçado e perfil eletroforético das proteínas de líquido cefalorraquidiano cuja frações protéicas se acham dentro dos limites normais. Legenda: pA, pré-albumina; A, albumina; globulinas: α_1 , α_2 , β e γ .

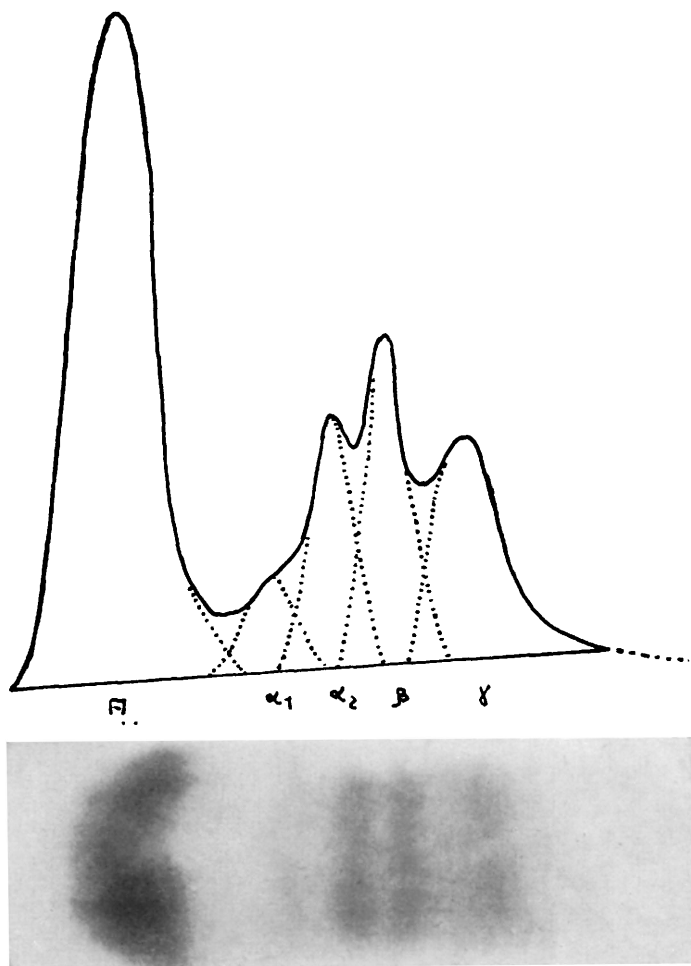


Fig. 2 — Traçado e perfil eletroforético de sôro sangüíneo cujas frações protéicas se acham dentro dos limites normais. Legenda: A, albumina; globulinas: α_1 , α_2 , β e γ .

Representação gráfica e cálculo dos resultados — Os valores encontrados pela fotometria são representados por pontos em papel milimetrado, com intervalos de 2 mm entre cada um; a figura resultante da união desses pontos constitui o *perfil eletroforético*³, no qual a área de cada fração é delimitada pelo método geométrico das curvas de frequência e medida por planimetria. O teor relativo de cada uma é calculado pela relação entre a área que a representa e a área total do perfil. Quando se desejar conhecer a concentração em mg de cada fração, relaciona-se o teor relativo à proteinorraquia total. Para ter-se uma representação esquemática que dê

idéia do percentual relativo de cada fração, são empregados gráficos nos quais a cada fração corresponde uma coluna de igual largura mas cuja altura é dada pelo seu teor relativo (fig. 3), representação esta adotada por Führ¹.

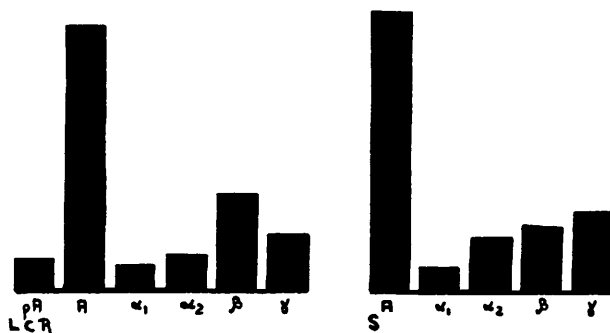


Fig. 3 — Representação esquemática dos teores relativos das frações protéicas do líquido cefalorraquidiano (LCR) e do soro sanguíneo (S) correspondentes às figuras 1 e 2. Legenda: pA, pré-albumina; A, albumina; globulinas: α_1 , α_2 , β e γ .

O reconhecimento de cada fração é feito pela sua mobilidade relativa; em nossa experiência, considerando 100 a mobilidade da albumina, a distância relativa percorrida pela pré-albumina varia entre 110 e 134; para as α -globulinas, entre 63 e 78; para as β -globulinas entre 47 e 58; para a γ -globulina entre 16 e 34. Quando duas globulinas alfa são evidenciadas a mobilidade de α_1 varia entre 70 e 85 e a de α_2 entre 56 e 70. Por véses a análise gráfica evidencia a fração β_2 ou τ : raramente a mobilidade relativa desta fração tem-se mostrado inferior ao mínimo da mobilidade relativa referida para a fração β . Como média, representam a mobilidade relativa das diversas frações os valores seguintes: pré-albumina, 121; globulinas: alfa, 71 (alfa-1, 77; alfa-2, 65); beta, 60, gama, 28. Estes valores correspondem àqueles que têm sido encontrados no mesmo laboratório para as frações protéicas do soro sanguíneo (globulinas: alfa-1, 77; alfa-2, 66; beta, 51; gama, 28).

Eletroforese em papel das proteínas do soro sanguíneo — É útil associar o estudo eletroforético das proteínas do LCR e do soro sanguíneo pois, assim, podem ser postos em evidência aspectos de interesse para o estudo de certas afecções neurológicas e das relações entre LCR e sangue. Para isto, as amostras devem ser colhidas na mesma ocasião, devendo o exame ser feito concomitantemente.

Para a eletroforese em papel das proteínas do soro sanguíneo as amostras são colhidas em jejum e o soro obtido é utilizado quando não houver hemólise. O método é semelhante ao descrito para o LCR não havendo necessidade de concentração prévia; a distribuição sobre o papel

de filtro do pequeno volume que contém 0,5 mg de proteínas totais (0,007 a 0,008 ml) não acarreta maiores dificuldades, não sendo necessárias variantes técnicas, como para o caso do LCR.

RESUMO

A técnica utilizada pelo autor para a eletroforese em papel das proteínas do líquido cefalorraquidiano é descrita em detalhe, segundo a experiência já obtida no laboratório da Clínica Neurológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Atendendo à utilidade prática de exame eletroforético das proteínas do soro sanguíneo, é exposta também a técnica utilizada para este exame.

SUMMARY

Paper strip electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins.

III. Technique

Paper strip electrophoresis technique for the examination of cerebrospinal fluid proteins is described and the details that makes the method more reliable, as indicated by author's experience, are given. Considering the value of electrophoretic data on serum proteins to neurologic diagnosis the technique utilised for this examination is also described.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. FÜHR, J. — Wie sind die Normalwerthe bei der elektrophoretischen Bluteiweissbestimmung? *Deutsch. med. Wschr.*, 81(16):642 (20 abril) 1956. 2. ROBOZ, E.; HESS, W. C.; TEMPLE, M. D.; WASHINGTON, M. S. — Paper electrophoretic estimation of proteins in cerebrospinal fluid. *J. Laborat. a. Clin. Med.*, 43(5):785-790 (maio) 1954. 3. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese das proteínas do líquido cefalorraquidiano. I. Considerações gerais sobre a eletroforese em papel. *Arq. Neuro-Psiquiat.*, 16(2):155-170 (junho) 1958. 4. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese em papel das proteínas do líquido cefalorraquidiano. II. Principais resultados registrados na literatura. *Arq. Neuro-Psiquiat.*, 16(3):223-235 (setembro) 1958.

Clínica Neurológica. Hospital das Clínicas da Fac. Med. da Univ. de São Paulo
— Caixa Postal 3461 — São Paulo, Brasil.