
PROTEÍNAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO

I. ESTUDO COMPARATIVO ENTRE MÉTODOS DE CONCENTRAÇÃO

LUCIA M. SINGER VERMES

Doenças do sistema nervoso central são freqüentemente acompanhadas de variações nos perfis eletroforéticos das proteínas do líquido cefalorraqueano (LCR), e o conhecimento destas variações têm muitas vezes valor diagnóstico. No entanto, sendo o LCR fluido com baixo teor protéico, há necessidade de concentrá-lo previamente para que o conteúdo protéico seja suficiente alto para ser corado de forma visível após separação eletroforética (assim como para se fazer estudos imuno-eletroforéticos e quantificar várias proteínas específicas). Os níveis de proteínas totais devem atingir 2 a 8 g/100 ml, os valores relativos das várias frações devem ser semelhantes àqueles encontrados no fluido original e não deve ocorrer desnaturação das proteínas durante o processo de concentração^{8,13}.

São numerosos os procedimentos indicados para a concentração do LCR. Muitas destas técnicas acham-se descritas na revisão feita por Lemmen e col.¹³, tais como a diálise (do material contido em sacos de celulose ou de celofane) contra soluções macromoleculares de dextrana, goma-arábica, polivinilpirrolidona, ultrafiltração sob pressão, precipitação com acetona, ultrafiltração sob vácuo e liofilização.

Mais recentemente foram descritos novos procedimentos ou modificações dos já existentes, para concentração, mediante diálise contra soluções macromoleculares^{2,5} ou contra polímeros secos^{8,11,12}, precipitação de proteínas com acetona¹⁸, álcool¹⁶ ou ácido tânico^{7,17} e pervaporação^{4,16}. Sistemas de centrifugo-ultrafiltração também têm sido adotados²¹, assim como a concentração por meio de bastonetes de gel hidrofílico seco de poliacrilamida que, colocados diretamente no recipiente que contém o fluido, absorvem substâncias de peso molecular menor que 20.000 daltons^{1,3}.

Resumo da tese de doutoramento "Líquido Cefalorraqueano Normal: métodos de concentração, proteinograma e imunoglobulinas", defendida no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.
* Professora Assistente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

Visando encontrar o método mais satisfatório para concentração de fluídos biológicos diluídos, vários pesquisadores efetuaram estudos comparativos entre os diferentes procedimentos. Estes estudos geralmente têm seguido metodologia que consiste em reconcentrar soros previamente diluídos (a 1:100 ou 1:200), efetuar eletroforese de proteínas destes materiais concentrados e comparar as composições relativas das frações protéicas àquelas obtidas por eletroforese do soro original. As conclusões a que chegaram os diferentes autores não foram concordantes, como se pode observar pelo resumo de alguns destes trabalhos, na tabela 1.

Por isto, propusemo-nos comparar a precisão e exatidão de quatro procedimentos de concentração de simples aplicação em laboratórios de rotina: ultrafiltração sob pressão positiva, absorção de substâncias de baixo peso molecular por gel hidrofílico seco de poli(acrilamida), centrífugo-ultrafiltração e diálise contra solução de goma-arábica.

Autores (Ano)	Métodos comparados	Métodos de escolha
McGarry & col. ¹⁶ (1955)	Pervaporação. Ultrafiltração sob vácuo. Ultrafiltração sob pressão positiva. Precipitação por álcool etílico.	Precipitação por álcool etílico
Lemmen & col. ¹⁴ (1957)	Diálise contra solução de polivinilpirrolidona. Precipitação por acetona. Ultrafiltração sob pressão positiva. Liofilização.	Diálise contra solução de polivinilpirrolidona.
Kaplan & Johnstone ⁸ (1966)	Ultrafiltração sob vácuo. Pervaporação. Diálise contra solução de polivinilpirrolidona. Diálise contra polímeros secos.	Ultrafiltração sob vácuo
Windisch & Bracken ²¹ (1970)	Ultrafiltração sob vácuo. Centrífugo-ultrafiltração.	Centrífugo-ultrafiltração
Kleine & col. ⁹ (1972)	Diálise contra solução de polietilenoglicol. Centrífugo-ultrafiltração. Liofilização. Ultrafiltração sob vácuo.	Liofilização ou ultrafiltração sob vácuo

Tabela 1 - Estudos comparativos entre métodos de concentração

MATERIAL E METODOS

Uma mistura de soros humanos (controle) com teor protéico de 7,1 g/100 ml, determinado pelo método de biureto 6, foi submetida 20 vezes à separação eletroforética de proteínas, em diferentes dias. Parte do controle foi diluído a 1:200 (em solução fisiológica), congelado em alíquotas de 10 ml, que foram utilizadas nos estudos sobre métodos de concentração.

Os procedimentos de concentração estudados foram: diálise (do material contido em sacos de celulose) contra solução a 50% de goma-arábica em tampão veronal-acetato; centrífugo-ultrafiltração, efetuado em equipamento Centriflo (Amicon Corporation), con-

forme descrito por Windisch & Bracken ²¹; ultrafiltração sob pressão positiva do material contido em sacos de celulose; método de absorção de substâncias de baixo peso molecular por bastonetes de gel hidrofílico seco de poliacrilamida (Lyphogel-Guelman), segundo instruções do fabricante.

Em diferentes dias amostras do controle diluído (1:200) foram concentradas pelos procedimentos acima relacionados e submetidas, em seguida, ao fracionamento eletroforético de proteínas. Os perfis eletroforéticos e as percentagens de cada fração protéica obtidos nos materiais concentrados foram comparados àqueles obtidos por eletroforese do controle.

As eletroforeses foram feitas sobre membranas de acetato de celulose em equipamento Mikrophor-Boskamp, utilizando o medidor de extinção e integrador combinados de fabricação Zeiss, modelo EI-3, segundo o método de Kohn ¹¹, modificado por Vaz e col. ¹⁹.

A precisão dos resultados obtidos por eletroforese do controle e dos concentrados por diferentes procedimentos foi avaliada, para cada fração protéica, pelo coeficiente de variação de Pearson, expresso em percentagem. Para verificar a exatidão dos métodos de concentração, os valores percentuais obtidos para cada fração protéica, do controle e dos concentrados, foram transformados em arco-seno $\sqrt{\text{percentagem}}$ de Snedecor e submetidos à análise de variância. Nos casos em que esta análise demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes, foi aplicado o teste de Tukey para verificar qual(is) procedimento(s) de concentração gerava(m) resultados que, em média, diferiam do controle e se os métodos de concentração forneciam valores médios diferentes entre si. O nível de rejeição estabelecido para estas análises foi de 5%.

RESULTADOS

Os primeiros resultados revelaram que tanto o método de ultrafiltração sob pressão positiva, como aquele em que se utiliza gel hidrofílico seco de poliacrilamida, não são recomendáveis por induzirem, com freqüência, desnaturação das proteínas. Este fenômeno é observável pela formação de rastros e acúmulo de material no ponto de aplicação na fita de acetato de celulose. Por isto estes dois procedimentos foram excluídos das análises estatísticas para averiguação de reprodutibilidade e exatidão dos métodos de concentração.

As médias e desvios-padrão calculados para cada fração, eletroforéticamente separada, do controle e dos concentrados por goma-arábica e por centrifugo-ultrafiltração, acham-se na tabela 2.

Os coeficientes de variação de Pearson (expressos em percentagem) calculados para as frações protéicas do controle e dos concentrados pelos dois procedimentos submetidos a tratamento estatístico, encontram-se na tabela 3. Pela análise deste quadro observa-se que a variação é maior que aquela obtida na eletroforese dos experimentos controle, nas frações pré-albumina e globulinas β dos concentrados por diálise contra goma-arábica e nas frações pré-albumina, globulinas α_1 , β e γ dos concentrados por centrifugo-ultrafiltração.

Fração	Controle (N = 20)		Concentrado por diálise contra so- lução de goma-ará- bica (N=20)		Concentrado por centrífugo-ultra- filtração (N=20)	
	\bar{X}	D.P.	\bar{X}	D.P.	\bar{X}	D.P.
Pré-albumina	0,7250	0,4435	0,7250	0,5494	0,7750	0,4992
Albumina	51,5500	2,5541	51,4250	1,7034	50,0750	2,1961
Globulinas:						
α_1	4,4000	0,6805	4,4500	0,6668	4,0750	0,6934
α_2	11,5750	1,0294	11,2750	0,5954	12,4000	1,0711
β	7,7000	0,6766	7,0000	0,7608	7,4250	0,9634
γ	24,0500	1,7006	25,1250	1,3942	25,2500	1,8743

Tabela 2 - Médias (\bar{X}) e desvios-padrão (D.P.) dos valores percentuais das frações proteicas obtidas por eletroforese do soro controle e dos materiais concentrados por diálise contra solução de goma-arábica e por centrífugo-ultrafiltração

A análise de variância demonstrou haver diferenças estatisticamente significantes, entre os 3 grupos estudados, quanto aos níveis percentuais de globulinas α_2 , β e γ , não ocorrendo tais diferenças quanto às outras frações. Os resultados destas análises estatísticas acham-se na tabela 4, na qual pode-se verificar que o valor médio de globulinas α_2 do material concentrado por centrífugo-ultrafiltração diferiu significativamente daqueles obtidos por eletroforese do controle e do concentrado por diálise contra goma-arábica. A taxa média de globulinas β foi significativamente mais baixa, em relação ao controle, quando o material foi previamente concentrado por diálise contra goma-arábica, não ocorrendo porém diferença significativa, quanto aos valores médios desta fração protéica, quando foram comparados os dois procedimentos de concentração. Tanto o método de diálise contra goma-arábica como o de centrífugo-ultrafiltração forneceram valores médios de globulinas γ mais elevados que aquele obtido por eletroforese do controle, não havendo, porém, diferença significativa entre as médias obtidas, para esta fração, após concentração do material pelos dois procedimentos estudados.

COMENTARIOS

Sendo difícil comparar diferentes métodos de concentração utilizando fluidos que, por natureza, contenham baixos níveis protéicos, foram avaliadas as taxas percentuais médias das frações protéicas de uma mistura de soros (controle) e a reprodutibilidade do método eletroforético utilizado, mediante cálculos dos coeficientes de variação de Pearson das respectivas frações protéicas. Esta

Coeficiente de variação de Pearson (em %) do:			
Fração	Controle	Concentrado por diálise contra solução de goma-arábica	Concentrado por centrifugo-ultra filtração
Pré-albumina	61,17	75,78	64,41
Albumina	4,95	3,31	4,39
Globulinas:			
α ₁	15,47	14,98	17,02
α ₂	8,89	5,28	8,64
β	8,79	10,87	12,98
γ	7,07	5,55	7,42

Tabela 3 - Coeficientes de variação de Pearson das frações proteicas obtidas por eletroforese do controle e dos concentrados por diálise contra solução de goma-arábica e por centrifugo-ultrafiltração

Fração	Valores F de Snedecor	Teste de Tukey		
		$\bar{X}_C - \bar{X}_{G.A.}$	$\bar{X}_C - \bar{X}_{C.U.}$	$\bar{X}_{G.A.} - \bar{X}_{C.U.}$
Pré-albumina	0,20	-	-	-
Albumina	2,82	-	-	-
Globulinas:				
α ₁	1,78	-	-	-
α ₂	7,69*	0,30	-0,82*	-1,12*
β	3,80*	0,70*	0,27	-0,43
γ	12,33*	-1,08*	-1,20*	-0,12

Tabela 4 - Valores F de Snedecor obtidos por análise de variância, de cada fração proteica, e diferenças entre as médias dos 3 grupos submetidos ao teste de Tukey. Os valores estatisticamente significantes estão assinalados com asterisco. Valores críticos: F de Snedecor = 3,15; Q.Qu (para o teste de Tukey) = 0,63, 0,68 e 0,85, respectivamente para os contrastes das globulinas α₂, β e γ. Legenda: \bar{X}_C , $\bar{X}_{G.A.}$, $\bar{X}_{C.U.}$: médias dos resultados obtidos por eletroforese do controle, concentrado por diálise contra solução de goma-arábica e por centrifugo-ultrafiltração, respectivamente.

mesma mistura de soros foi diluída a 1:200 de forma a conter taxa de proteínas totais dentro da faixa de normalidade do LCR²⁰; amostras deste material diluído foram então concentrados 100 a 200 vezes pelos 4 diferentes procedimentos estudados e submetidos à eletroforese de proteínas.

A ultrafiltração sob pressão positiva acarretou, com alta frequência, desnaturação de proteínas verificável por grande acúmulo de material no ponto de aplicação da eletroforese e pela formação de rastros. Estas alterações na estrutura das proteínas, tanto poderiam ser devidas à lentidão deste processo, pois para concentrar 100 a 200 vezes, 10 ml do fluido diluído, são necessárias cerca de 48 horas, como ao fato da pressão ter sido efetuada mediante ar comprimido, ao invés de nitrogênio que é mais inerte.

A concentração efetuada por absorção de substâncias de peso molecular menor que 20.000 daltons por gel hidrofílico seco de poliacrilamida, adicionado diretamente ao material que se deseja concentrar, apesar de ser método promissor pela sua simplicidade, revelou ser ineficiente por também causar, com frequência, desnaturação de proteínas. Cumpre ressaltar no entanto, que alterações grosseiras no perfil eletroforético devido à desnaturação de proteínas não foram observadas quando o material era concentrado menos de 100 vezes.

Foram obtidos perfis eletroforéticos apresentando 6 frações protéicas nitidamente separadas, quando a eletroforese foi realizada nos concentrados por diálise contra solução de goma-arábica e por centrífugo-ultrafiltração.

Os coeficientes de variação de Pearson calculados para albumina dos concentrados por diálise contra goma-arábica (3,31%) e por centrífugo-ultrafiltração (4,39%) são comparáveis ao coeficiente de variação de Pearson calculado para albumina de controle (4,95%). O mesmo ocorreu em relação às globulinas γ : o coeficiente de variação de Pearson do controle foi de 7,07% e dos concentrados por diálise contra solução de goma-arábica e por centrífugo-ultrafiltração foram de 5,55 e 7,42%, respectivamente. Assim, a reprodutibilidade de ambos os métodos é satisfatória, levando em consideração as duas frações mais importantes na prática neurológica: albumina e globulinas γ . Quanto às outras frações protéicas, foi verificado que principalmente a pré-albumina do material concentrado por diálise contra solução de goma-arábica e as globulinas β do concentrado por centrífugo-ultrafiltração apresentaram reprodutibilidade inferior à do controle.

As médias de albumina obtidas por eletroforese do controle (51,55%), dos concentrados por diálise contra solução de goma-arábica (51,425%) e por centrífugo-ultrafiltração (50,075%), não diferiram significativamente entre si. Já as médias calculadas para a fração globulinas γ dos concentrados por diálise contra solução de goma-arábica (25,125%) e por centrífugo-ultrafiltração (25,250%), embora não diferindo significativamente entre si, foram diferentes da média de globulinas γ calculada para o controle (24,050%), diferenças estas estatisticamente significantes. Assim, embora no que tange à albumina ambos os métodos de concentração sejam exatos, nenhum deles pode ser considerado totalmente satisfatório quanto à exatidão dos resultados de globulinas γ .

Os estudos sobre exatidão dos métodos no tocante à pré-albumina e globulinas α_1 , não revelaram diferenças significantes entre as médias obtidas por eletroforese do controle e dos concentrados pelos dois procedimentos em questão. A diálise contra solução de goma-arábica, no entanto, acarretou valor médio de globulinas β inferior àquele obtido por eletroforese do controle, embora não haja diferença significativa entre as médias destas globulinas quando são comparados os dois procedimentos de concentração. Foi ainda observada diferença significativa entre os valores médios obtidos para globulinas α_2 , dos materiais submetidos à diálise contra solução de goma-arábica e à centrífugo-ultrafiltração; este último procedimento também acarretou valores médios significativamente mais elevados de globulinas α_2 , em relação ao controle

Em linhas gerais pode-se afirmar que, embora não dispondo de um método de concentração que possa ser considerado ideal, tanto a centrífugo-ultrafiltração como a diálise contra solução de goma-arábica são métodos de simples execução e reprodutíveis, devendo-se no entanto ressaltar que a diálise contra solução de goma-arábica é procedimento bem menos oneroso que a centrífugo-ultrafiltração.

RESUMO

No intuito de escolher entre métodos de concentração, aplicáveis ao LCR, aquele que, não provocando desnaturação de proteínas, seja o mais exato, preciso e de fácil aplicação em laboratórios de rotina, foram estudados quatro procedimentos: diálise contra solução de goma-arábica, centrífugo-ultrafiltração, absorção de substâncias de baixo peso molecular por gel seco de poliácridamida e ultrafiltração sob pressão positiva. Concluiu-se que a diálise contra solução de goma-arábica, por ser preciso, relativamente exato, simples e pouco oneroso, é o mais satisfatório dentre os métodos estudados.

SUMMARY

Cerebrospinal fluid proteins: I. Comparison of protein concentration methods.

Four protein concentration methods, applicable to cerebrospinal fluid, were compared in order to choose a procedure that not causing protein denaturation, is accurate, precise and easy to perform in routine laboratories. The studied methods were: dialysis against arabic-gum solution, centrifuge-ultrafiltration, absorption of low molecular weight substances by dry polyacrylamide gel and pressure ultrafiltration. Blood serum was diluted, then concentrated by these procedures and analyzed by cellulose acetate electrophoresis; the undiluted serum served as control.

It was observed that two methods: pressure ultrafiltration and absorption of low molecular weight substances by polyacrylamide hydrogel, are not suitable for concentrating diluted fluids because they frequently cause protein denaturation.

It was concluded that dialysis against arabic-gum is the most suitable, of the methods studied, for application in routine laboratories taking in account that this procedure is precise, relatively accurate, simple and of low cost.

REFERENCIAS

1. ANGELA, G. C. — Le proteine nei liquidi biologici (siero escluso). *Minerva med.* 64:219, 1973.
2. COLOVER, J. — A micro technique for protein concentration suitable for quantitative electrophoresis of cerebrospinal fluid. *J. clin. Path.* 14:559, 1961.
3. CURTAIN, C. C. — Concentrating protein solutions. *Nature*, 203:1380, 1964.
4. FAULKNER, W. R.; GARDNER, M. & LEWIS, L. A. — The concentration of low-protein body fluids. *Clin. Chem.* 8:424, 1962.
5. GOA, J. & TVENTEN, L. — Electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins in certain neurological disorders. *Scand. J. clin. Lab. Invest.* 15:152, 1963.
6. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. biol. Chem.* 177:751, 1949.
7. GREENWALT, T. J.; STEANE, E. A. & van OSS, C. J. — Improved method for concentrating urine proteins applied to the detection of Bence-Jones proteinuria. *Fed. Proc.* 25:612, 1966.
8. KAPLAN, A. & JOHNSTONE, M. — Concentration of cerebrospinal fluid proteins and their fractionation by cellulose acetate electrophoresis. *Clin. Chem.* 11:717, 1966.
9. KLEINE, T. O.; STROH, M. & STROH J. — Comparison of four different methods to concentrate human cerebrospinal fluid. *In World Congress of Anatomic and Clinical Pathology*, 8º, Munich, 1972. p. 65 (*Excerpta Medica International Congress series*, v. 262).
10. KOHN, J. — A new supporting medium for zone electrophoresis. *Biochem. J.* 65:9, 1957.
11. KOHN, J. — A simple method for the concentration of fluids containing protein. *Nature* 183:1055, 1959.
12. KWAPINSKY, J. B. G. — Methodology of Immunochemical and Immunological Research. Willy Interscience, New York, 1972, p. 223-224.
13. LEMMEN, L. J.; NEWMAN, N. A. & DeJONG, R. N. — Study of cerebrospinal fluid proteins with paper electrophoresis: I. a review of literature. *Univ. Mich. med. Bull.* 23:3, 1957.
14. LEMMEN, L. J.; TOURTELLOTTE, W. W.; GLIMN, J. G.; HIGGINS, J. E. & PARKER, J. A. — Study of cerebrospinal fluid proteins with paper electrophoresis. IV. methods for concentrating dilute protein solutions. *Univ. Mich. med. Bull.* 23:135, 1957.
15. MATSON, C. F. — A procedure for agar gel electrophoresis. *Amer. J. clin. Pathol.* 37:143, 1962.
16. McGARRY, E.; SEHON, A. H.; ROSE, B. — The isolation and electrophoretic characterization of the proteins in the urine of normal subjects. *J. clin. Invest.* 34:832, 1955.
17. MEJBAUM-KATZENELLENBOGEN, W.; DOBRYSZYCKA, W.; BOGUSLAWLKA-JAWORSKA, J. & MORAWIECKA, B. — Regeneration of protein from insoluble protein-tannin compounds. *Nature* 184:1799, 1959.
18. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese em papel das proteínas do líquido cefalorraquidiano. III. técnica. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 16:236, 1958.
19. VAZ, C. A. C., FERRI, R. G.; GEISHOVEL, N. & CAMPOS, A. N. P. — Eletroforese sobre acetato de celulose (CAF). Reprodutibilidade e valores normais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* (São Paulo) 31:71, 1971.
20. VERMES, L. M. S.; FERRI, R. G.; AISEN, J. & MARLET, J. M. — Proteínas totais do líquido cefalorraqueano obtido por punção da cisterna magna: valores normais (variações ligadas ao sexo). *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 34:315, 1976.
21. WINDISCH, R. M. & BRACKEN, M. M. — Cerebrospinal fluid proteins: concentration by membrane ultrafiltration and fractionation by electrophoresis on cellulose acetate. *Clin. Chem.* 16:416, 1970.