

ATUALIZAÇÕES

ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO I. CONSIDERAÇÕES GERAIS SÔBRE A ELETROFORESE EM PAPEL

A. SPINA-FRANÇA *

A introdução da eletroforese no estudo das frações protéicas dos líquidos orgânicos abriu novos horizontes para o esclarecimento de afecções que já haviam esgotado o arsenal dos métodos habituais de indagação.

Quando uma mistura de substâncias em estado coloidal é submetida à influência de um campo elétrico, as micelas elêtricamente carregadas se deslocam em direção ao pólo elétrico de carga contrária, percorrendo distâncias diferentes, em tempo idêntico, por se deslocarem com velocidades diversas. A êsse processo de separação de partículas coloidais foi dado o nome de *cataforese* (Hardy) ou de *eletroforese* (Michaelis); esta última denominação prevaleceu, sendo reservada para a separação de partículas de grande peso molecular; para ions menores, é usada a expressão *iontoforese*.

O conhecimento físico-químico do processo eletroforético pouco progrediu desde as primeiras observações de William Hardy (1905) até 1930, quando surgiram os estudos de Theorell sôbre a diferença entre a migração da albumina e globulina. Desde então começam os estudos de Arne Tiselius⁶⁹, que definiu os caracteres da migração eletroforética, ideou aparelho para separar e avaliar os principais constituintes de misturas de substâncias de grande peso molecular, como sejam as proteínas, e demonstrou que a globulina do sôro sangüíneo é substância heterogênea, constituída de três frações: *alfa*, *beta* e *gama*.

O método introduzido por Tiselius é conhecido pela denominação de *eletroforese livre*, pois as partículas migram na solução tampão contida em tubo ou célula de vidro. Várias modificações foram introduzidas na aparelhagem para a obtenção de resultados mais precisos e para a utilização de menor volume de material. Entre estas se destaca a *microeletroforese* (Antweiler), que tornou o método mais utilizável no estudo de líquidos biológicos de pequena concentração protéica, como o líquido cefalorraquidiano.

* 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.

A mesma vantagem oferece outra variante de caráter prático — a *eletroforese de zona* — na qual a célula de migração é substituída por suporte poroso embebido em solução tampão. Dentre os suportes tentados, mostrou-se mais prático o *papel de filtro*. Seu emprêgo foi iniciado simultaneamente por vários grupos de pesquisadores (Wieland e Fischer, Durrum, Turba e Enenkel, Cremer e Tiselius), cujos estudos foram publicados entre 1949 e 1950.

ELETROFORESE LIVRE

Em nosso meio Hoxter e Wajchenberg³⁵, em trabalho de caráter prático, apresentaram uma sùmula do que se conhece sôbre a constituição das proteínas plasmáticas. Entre os métodos empregados para o estudo destes constituintes do sangue, êstes autores dedicaram atenção especial à eletroforese livre, revendo os caracteres da migração das diferentes frações protéicas do plasma, analisando os diversos fatores que a influenciam e discutindo os principais dados sôbre a aparelhagem e para a obtenção do resultado final. Os mesmos autores, em publicação seguinte³⁶, resumiram a interpretação dos achados eletroforéticos, adotando a esquematização proposta por Wuhrmann, segundo a qual as doenças se distribuem em seis constelações para as quais são comuns os achados eletroforéticos quanto à discriminação das frações protéicas do sôro sangüíneo.

A *constelação I* se caracteriza pela diminuição da albumina e pelo aumento das globulinas α e γ (processos inflamatórios agudos); a *constelação II*, por alterações semelhantes mas menos intensas (processos inflamatórios subagudos); a *constelação III*, por diminuição da albumina e aumento das frações β e γ (lesões difusas do parênquima hepático, tuberculose pulmonar, linfossarcoma, entre outras); a *constelação IV*, por diminuição da albumina e aumento de tôdas as frações globulínicas (síndrome nefrótica, fases terminais da tuberculose, caquexia, etc.); a *constelação V*, por diminuição da albumina e aumento da globulina γ (γ -plasmocitomas, certos tipos de leucemias, poliartrite crônica, moléstia de Nicolas-Favre, leishmaniose, etc.); a *constelação VI*, por diminuição da albumina e aumento da globulina β (β -plasmocitomas, carcinomas com metástases, leucemia linfática, etc.).

Nessa mesma publicação, Hoxter e Wachenberg³⁶ analisaram a composição bioquímica da albumina, das frações globulínicas (α_1 , α_2 , β , γ) e do fibrinogênio, permitindo assim a compreensão fisiopatogenética dessas constelações.

Numerosos trabalhos demonstram o valor da eletroforese livre e a exatidão de seus resultados; entretanto, êste método exige aparelhagem custosa, só acessível a laboratórios de grande porte, anexados a institutos científicos bem dotados. Para investigações de caráter prático foram propostas técnicas simplificadas que, sem prejudicar o valor do método, visam afastar os óbices do alto custo da aparelhagem e da delicadeza técnica da eletroforese livre. Destas modificações a eletroforese em papel de filtro mereceu a preferência pela simplicidade de execução e pela qualidade dos resultados.

ELETROFORESE EM PAPEL

A simplicidade da aparelhagem e da técnica da eletroforese em papel de filtro, ou, simplesmente, *eletroforese em papel* (EFP), tornou o método acessível ao laboratório clínico, difundindo rapidamente seu emprego. Por isso, a maior parte das contribuições utilizando a eletroforese para o estudo das proteínas do soro sanguíneo em patologia humana foi obtida com este método; o acervo de trabalhos acumulados até o presente é de tal ordem que Grassmann²⁸ considera impossível uma revisão bibliográfica completa.

Para as vantagens da eletroforese em papel sobre a eletroforese livre foi o próprio Tiselius, em trabalho com Kunkel¹³, quem chamou a atenção: o método é de execução simples, exige menor quantidade de material e proporciona separação real das frações protéicas, pois cada porção do papel representa um verdadeiro tubo de ensaio que contém a fração separada. É exato que, como salientam Köiw, Wallenius e Grönwall⁴², o método só apresenta vantagens no âmbito clínico porque os resultados são menos precisos que os da eletroforese livre; com efeito, para a eletroforese em papel, Floden²⁶ admite um erro de 5 a 10%, enquanto que, para a eletroforese livre, o erro admissível é de apenas 0,1%. Entretanto, esta diferença, embora comprometa a reprodutibilidade⁶⁶, está dentro dos limites da indagação clínica por ser inferior às variações de caráter patológico e às verificadas entre pessoas sadias²⁴.

A aparelhagem usada para a eletroforese em papel consta de uma tira de papel de filtro, cujas extremidades penetram em duas cubas, cada uma ligada a um dos pólos da corrente elétrica; a transmissão da corrente nesse sistema se faz através de solução tampão contida nas cubas e que embebe a tira de papel. A mistura coloidal em estudo é colocada sobre a tira de papel e migra em direção ao pólo elétrico de carga contrária.

Vários são os aparelhos usados, sendo fundamentais os seguintes¹⁷: o de Wieland e Fisher e o de Grassmann e Hannig, nos quais a tira de papel permanece estendida horizontalmente entre as duas cubas; o de Durrum, no qual a tira é suspensa, pela sua metade, entre as cubas; o de Cremer e Tiselius e o de Kunkel e Tiselius, nos quais o papel também é colocado horizontalmente entre as cubas, mas, para evitar evaporação permanece dentro de banho de líquido orgânico não solúvel em água ou entre placas de vidro. Para esta última variante, foi ideado um modelo especial pelos brasileiros Rodrigues e Ribeiro⁵⁸.

As proteínas têm a propriedade de serem anfóteras, podendo migrar em uma ou outra direção conforme o pH do meio em que se encontram. Para as proteínas do soro sanguíneo, melhor separação é obtida em meio alcalino (pH 8,5 a 9), no qual a carga elétrica das proteínas se torna negativa; elas migram, portanto, em direção ao pólo positivo e suas frações se separam por se deslocarem com velocidades diferentes.

A amostra a examinar é distribuída na parte da tira do papel que está mais próxima do pólo negativo (fig. 1) e, depois da passagem da corrente

elétrica durante tempo necessário para obter boa separação entre as frações — tempo que é variável conforme o método empregado — o papel é retirado do aparelho e pôsto a secar. Em seguida, a tira de papel é corada com substância que tenha a propriedade de se ligar às proteínas em proporções estáveis; removido o excesso de corante, ficam sôbre a tira de papel as manchas coradas, que representam cada uma das frações que foram separadas. Por vêzes, entre o ponto de distribuição do material e o início da faixa da γ -globulina, o papel corado mostra uma tonalidade mais carregada, em contraste com as demais porções do papel onde não há frações protéicas, porções essas que se apresentam bem claras. Este fato ocorre porque as proteínas ao migrarem deixam atrás de si um rastro ou “tapête” explicado pela adsorção de partículas de cada fração ao papel de filtro. A adsorção depende da espessura do papel e do estado de conservação do material analisado³¹.

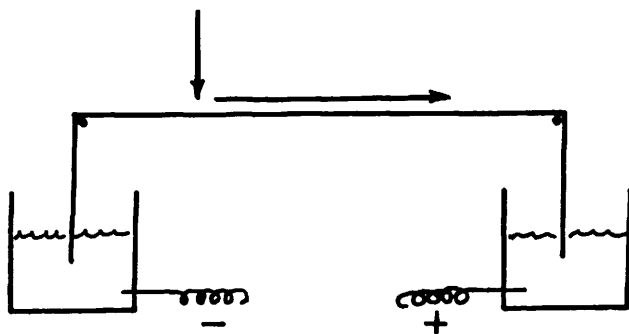


Fig. 1 — Esquema de um aparelho de eletroforese de tipo Grassmann e Hannig, no qual o papel é mantido horizontalmente entre as duas cubas que contém solução tampão e que são ligadas aos pólos da corrente elétrica. A flecha vertical indica o ponto onde é colocada, sôbre o papel, a amostra de LCR em estudo; a flecha horizontal mostra o sentido da migração das frações protéicas.

Enquanto que na eletroforese livre o reconhecimento das frações protéicas é obtido mediante o cálculo da respectiva velocidade de migração eletroforética a partir de dados conhecidos — distância percorrida pela partícula, tempo de passagem da corrente elétrica, caracteres do campo elétrico e influência do aparelho — na eletroforese em papel esse reconhecimento não é tão simples, pois o papel de filtro apresenta uma série de particularidades que dificultam ou mesmo impossibilitam a determinação correta de certos fatores — influência da aparelhagem e da distância percorrida pela partícula — prejudicando a determinação da velocidade de migração.

Realmente, na eletroforese em papel a influência do suporte de migração, isto é, o papel de filtro, não constitui fator constante, dependendo da qualidade do papel, que é variável, pois a celulose apresenta diferenças conforme o vegetal da qual é

extraída. Além disso, cada papel apresenta particularidades especiais quanto à estrutura e à espessura. Não é possível, por isso, estabelecer uma constante para representar a influência do papel de filtro na eletroforese.

Por outro lado, a distância percorrida por uma partícula no papel de filtro não é apenas aquela que medeia entre o ponto inicial e o ponto em que essa partícula se encontra quando a eletroforese é interrompida, pois a migração se dá tanto pela superfície, como pelos poros do papel que constituem verdadeira rede capilar, de tal forma ramificada que, para uma grama de papel, a superfície interna dessa rede corresponde a cerca de 500 m², segundo cálculos referidos por Madeira³⁰.

Além disso, não é apenas por esse modo direto que o papel modifica a distância percorrida pelas partículas; durante a passagem da corrente elétrica formam-se na solução tampão correntes líquidas de sentido variável, na dependência de fenômenos que ocorrem no próprio papel. Assim, quando ele é umedecido com solução tampão, torna-se eletricamente ativo, resultando disso o estabelecimento de uma corrente líquida no seu sistema capilar em direção à cuba ligada ao pólo negativo: é a corrente de eletro-osmose. Por sua vez a passagem da corrente elétrica aquece o papel, evaporando parte do líquido tampão que o embebe; como resultado formam-se outras correntes líquidas, a partir de cada cuba e em direção ao centro da tira de papel.

Essas correntes interferem, opondo-se à migração eletroforética; segundo dados citados por Fine e col.²³, após certo tempo de passagem da corrente elétrica, variável conforme a natureza da solução tampão utilizada, as partículas ocupam, no papel, uma posição que representa a soma algébrica da sua velocidade de migração e das correntes líquidas da própria solução tampão.

Além dessas, outras correntes líquidas se formam durante a secagem da tira — de suas extremidades mais umedecidas para o seu centro — produzindo modificações na posição ocupada pelas partículas³¹.

De tal forma se imbrica a ação dos fatores acima referidos que *se torna desprovida de valor a determinação da velocidade de migração de uma partícula na eletroforese em papel*. Na prática, o reconhecimento das frações protéicas separadas pela eletroforese em papel se faz pela sua *mobilidade relativa*, considerando, como base, a distância entre o ponto de partida inicial e a posição final das partículas de albumina. Assim, segundo Hoxter³⁴, considerando a distância percorrida pela albumina como sendo equivalente a 100%, a distância percorrida pela globulina α_1 está situada entre 75 e 90%; a da globulina α_2 , entre 60 e 70%; a da globulina β , entre 45 e 55%; a da globulina γ , entre 20 e 35%.

O simples exame da tira de papel corada dá idéia do comportamento das várias frações protéicas separadas. Quando se quer ter dados mais exatos, representam-se os resultados em um gráfico denominado *perfil eletroforético* ou *eletroferograma*, nome êste consagrado pelo uso, embora o termo correto seja o de *eletroforesigrama*⁴⁹.

Para representar o perfil eletroforético utilizam-se os valores, obtidos mediante fotometria, da densidade óptica de cada porção da tira de papel. A *fotometria* pode ser feita a partir da tira de papel que para isso é cortada, no sentido da sua largura, em pequenas porções iguais que são colocadas em quantidades certas de uma solução especial, onde o corante se dilui. Método mais simples é aquêle no qual a intensidade da cor é determinada em distâncias certas, diretamente na tira de papel, por meio de fo-

tômetro especial (*densitômetro*). Os resultados obtidos por êsses métodos são comparáveis e correspondem-se quando aquêles obtidos pela técnica da diluição são multiplicados por um fator de correção para as globulinas²⁴.

Os valores da densidade óptica das partes do papel de filtro sucessivamente medidos são transpostos para papel milimetrado e, depois, unidos entre si, obtendo-se uma linha cujas deflexões reproduzem a posição das diversas frações no papel de filtro. Para conhecer o teor relativo de determinada fração protéica, somam-se os respectivos valores da densidade óptica ou separa-se no gráfico a área que a representa; as áreas das diferentes frações podem ser delimitadas pelo traçado das curvas de frequência ou por linhas paralelas que descem perpendicularmente dos pontos de maior deflexão até a linha de base. A *linha de base* ou linha de referência é a reta que delimita inferiormente o perfil eletroforético; para traçá-la, tomam-se em referência dois pontos, que são os extremos do perfil: o primeiro é aquêle onde se inicia a representação da γ -globulina e, o segundo, aquêle onde termina a albumina. Para alguns a linha de base é a reta que une êsses dois pontos²⁵; para outros é a horizontal correspondente à média⁶⁷ e, para outros, é a horizontal que passa pelo segundo ponto.

Delimitada cada fração protéica, sua área pode ser *planimetrada* ou *calculada geomêtricamente*. Esta técnica só pode ser utilizada quando as áreas das frações são separadas pelas suas curvas de frequência²⁷. Considerando o valor da área total do perfil como sendo equivalente a 100%, a cada fração é atribuído o percentual correspondente ao tamanho de sua área (teor relativo ou simplesmente *teor*). A concentração absoluta ou, simplesmente, *concentração* de cada fração não pode ser obtida diretamente; entretanto, conhecendo-se a concentração protéica total, pode ser calculada a partir dos teores relativos.

A eletroforese das proteínas em papel de filtro gerou inicialmente decepções por terem sido registrados dados contraditórios. Entretanto, pesquisas ulteriores vieram mostrar não serem tais contradições atinentes ao método e, sim, devidas a imprecisões na técnica, a conclusões precipitadas e, especialmente, ao fato de ter sido exigido do método mais do que permitem seus limites de precisão. Como salientam Azerad e col.³, a *eletroforese em papel é método excelente do ponto de vista qualitativo e bom do ponto de vista semiquantitativo*. Respeitadas as limitações, o método oferece dados úteis para o diagnóstico, para o prognóstico e para a evolução. Em certas eventualidades, seus resultados devem ser completados com métodos de maior precisão, como seja o da eletroforese livre.

ELETOFORESE EM PAPEL DAS PROTEÍNAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Fundamentalmente, a EFP das proteínas do líquido cefalorraquidiano (LCR) obedece à mesma sistematização técnica utilizada para o estudo das proteínas do sôro sanguíneo. Antes de se dedicar ao estudo do LCR é ne-

cessário que o laboratorista se familiarize com a execução do método em relação às proteínas do soro sanguíneo, material que é de fácil obtenção e que, por outro lado, não exige concentração prévia como é necessário para o LCR. Como material de fácil deterioração e contaminação, o LCR deve ser utilizado logo; quando conservado em condições estéreis e em baixa temperatura, poderá ser utilizado, no máximo, até uma semana após a colheita. Parte da amostra de LCR colhida é usada para a determinação da proteinorraquia total pelos métodos habituais, sendo o restante reservado para o exame eletroforético; a parte destinada a este exame (cêrca de 5 a 10 ml) é centrifugada logo após a colheita para eliminar os elementos celulares.

Concentração — Para a EFP são necessários cêrca de 0,5 mg de proteínas, quantidade contida em um volume de LCR que não pode ser aplicado diretamente sobre a tira de papel, tornando-se necessário concentrar o material até um volume de 0,01 a 0,04 ml, aproximadamente.

O método mais utilizado para a concentração é o da *diálise*, tendo sido utilizadas inicialmente algumas variantes da técnica de Oncley; entretanto, a diálise mediante o emprêgo de soluções concentradas de compostos macromoleculares (goma arábica, dextrana, polivinilpirrolidona) é o processo de emprêgo mais difundido pela sua simplicidade. Em geladeira, ou em temperatura ambiente, obtêm-se concentração satisfatória (100-200 vezes), partindo de volumes variáveis em um ou dois dias, tempo que pode ser reduzido pelo emprêgo de agitadores magnéticos na solução macromolecular³¹ ou pela evaporação prévia em corrente de ar. O LCR é colocado dentro de saco de celofane, que é imergido no líquido concentrador, composto de solução tampão e da substância macromolecular escolhida (goma arábica a 40-50%, dextrana a 10-20%, polivinilpirrolidona a 10-30%).

Na concentração por *ultrafiltração*, o emprêgo de membrana especial que não permite a passagem de proteínas²¹ diminui de muito o tempo da operação, sendo possível obter concentrações suficientes em 2 a 6 horas. Utiliza-se aparelhamento especial quando o líquido a concentrar é forçado contra a membrana filtrante por aumento da pressão no interior da câmara onde está contido^{19,30,36} ou, com aparelhagem simples, quando a ultrafiltração se processa no vácuo estabelecido no recipiente para onde o líquido é filtrado. Redução maior no tempo é obtida quando essa membrana especial é substituída por membrana de colódio³²; utilizada também no método de centrifugo-ultrafiltração⁵³, no qual o LCR, contido em saco de colódio, é centrifugado dentro de tubo de ebonite perfurado, escapando o LCR filtrado sob o efeito da força centrífuga.

A concentração por *evaporação* no vácuo quando feita em temperatura ambiente é obtida em tempo variável, segundo o método; evita-se o inconveniente do excesso de concentração de sais quer por diálise prévia contra água, quer por diálise concomitante contra solução tampão. A evaporação no vácuo e em baixa temperatura (*liofilização*) costuma ser precedida — para a retirada de sais — da passagem do LCR por resina troca-ions¹⁸, de diálise contra água destilada, contra solução tampão ou contra solução fisiológica.

A concentração por *precipitação* se faz por meio da acetona em temperatura próxima à da congelação^{16,51}. O excesso de sais é corrigido pela sua laqueação a substância troca-ions, como o Verseno, juntada ao LCR ou ao precipitado.

Todos os processos de concentração são passíveis de discussão. Na diálise contra substância macromolecular, quantidades mínimas desta última podem passar para o interior do saco onde se acha o LCR, misturando-se com êle; durante a eletroforese o composto macromolecular pode ser arrastado até onde se acham as últimas frações globulínicas, o que prejudica a avaliação dos resultados. No processo de

precipitação por acetona, quando não é mantida temperatura baixa, pode ocorrer desnaturação das proteínas, do que resulta mancha espessa no ponto do papel onde foi distribuído o material. Quanto aos processos de ultrafiltração, embora sejam menores os riscos de contaminação e de desnaturação, a necessidade de aparelhagem especial dificulta seu emprêgo. O alto custo da aparelhagem para a liofilização impede, também, a maior utilização d'êste método em laboratórios clínicos.

Entretanto, todos os métodos descritos para a concentração do material dão resultados comparáveis, quando criteriosamente utilizados. Os resultados com o LCR podem ser controlados pela análise de amostra de sôro sangüíneo prèviamente diluído e, depois, reconcentrado; comparam-se, assim, os resultados eletroforéticos obtidos para a amostra inicial e para a parte diluída e reconcentrada. Os resultados da concentração também podem ser verificados pela utilização de reações coloidais em duas porções de um mesmo LCR, uma das quais foi concentrada e, depois, rediluída.

Nas fases seguintes a técnica da eletroforese das proteínas do LCR se superpõe à utilizada para o sôro sangüíneo, cujas etapas já foram referidas.

COMPONENTES PROTÊICOS E CARACTERÍSTICOS DO PERFIL ELETROFORÉTICO DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

Hesselvik³², em 1939, estudando eletroforéticamente a composição das proteínas de alguns líquidos biológicos incluiu os resultados encontrados em duas amostras de LCR de pacientes portadores de neurolues, nas quais demonstrou a presença de albumina e γ -globulina. Em 1942, Kabat, Landow e Moore³⁸ descreveram o perfil eletroforético das proteínas do LCR, considerando-o como semelhante ao do sôro sangüíneo, isto é, contendo as mesmas frações protêicas que êsse último, embora fizessem restrições quanto à presença constante de α -globulina; entretanto, em publicação ulterior³⁹, êstes autores mostraram que são idênticas as mobilidades das frações protêicas do LCR e do sôro sangüíneo e registraram a presença, no LCR, de um componente cuja migração era mais rápida que a albumina. Scheid e Scheid⁶⁰, em 1944, identificaram as mesmas frações. A esta fase inicial de estudos em que foi empregada a eletroforese livre, também se prendem as publicações de Booij^{11, 12, 13} que, introduzindo artefatos na célula de migração, procurava contornar o problema do grande volume de LCR que era necessário para essas pesquisas (100 a 200 ml).

A presença, no LCR, das mesmas frações protêicas existentes no sôro sangüíneo também foi demonstrada em 1950 por Ewerbeck²², utilizando o método *microeletroforético*, processo que também foi usado por Labhart, Schweizer e Staub (1951)⁴⁴, que confirmaram êsses achados. A partir de 1951, a *eletroforese em papel* tem sido aplicada ao estudo das proteínas do líquido cefalorraquidiano. Wallenius⁷² considera êste método como de escolha para o estudo do LCR, pois o volume (5 a 10 ml) que contém a quan-

tidade de proteínas (0,5 mg) suficiente para a análise é facilmente obtido na prática.

Em relação ao sôro sangüíneo, o perfil eletroforético do LCR se caracteriza, segundo Bauer ⁸, *pela presença de uma fração de migração mais rápida que a albumina (pré-albumina), pela diferenciação menos nítida das α -globulinas, pela presença da fração τ e pela menor delimitação entre cada uma das frações*. Quanto maior for a proteinorraquia total, menores serão as quantidades relativas da fração pré-albumina e da fração τ ⁴⁰.

Como no sôro sangüíneo, a *albumina* do LCR constitui a maior fração, representando praticamente a metade da taxa total das proteínas; entretanto, o teor relativo das frações globulínicas é diferente. No sôro sangüíneo os teores globulínicos de α_1 , até γ aumentam progressivamente; no LCR há predominio da fração β . predominância esta que serviu de argumento para caracterizá-la como fração formada a partir do próprio parênquima nervoso (*cerebrogener Anteil*, de Esser ²⁰).

Na interpretação do perfil eletroforético do LCR toma-se, como base, a proporção da globulina β ; seu aumento é relacionado, de modo geral, a processos degenerativos do parênquima nervoso e sua diminuição relativa tem sido considerada como indicadora do franqueamento da barreira hemoliquórica à passagem de outras frações (especialmente albumina) ⁴⁵. Schöenberg ⁶⁴ discute a origem cerebrógena da β -globulina, preferindo relacionar sua formação às células das leptomeninges.

As funções carreadoras das globulinas, bem estabelecidas em relação ao sôro sangüíneo ⁴, não estão ainda completamente esclarecidas em relação ao LCR; a distribuição das glicoproteínas pelas diferentes frações globulínicas do LCR tem-se mostrado semelhante à do sôro sangüíneo ^{6, 9}, mas há diferenças com relação às lipoproteínas, pois, além da proporção ser menor ⁵, a distribuição é diversa; devem ser salientadas, por outro lado, a ausência de β -lipoproteína no LCR normal ^{5, 7, 9} e sua presença, em material patológico ^{7, 10}, assim como variações no tipo das α -lipoproteínas ⁵ e a presença de componente albumínico ⁶⁵.

A *pré-albumina* é uma fração que migra mais rapidamente que a albumina. Fisk e col. ²⁵, estudando esta fração, mantiveram a denominação de fração X, introduzida por Kabat e col. ³⁸, e verificaram ser de 9% seu teor médio e que sua mobilidade eletroforética é 1,3 vezes superior à da albumina. Uma *segunda fração pré-albumínica*, migrando ainda mais rapidamente — denominada X_1 — foi verificada em alguns casos. Para Hoch e Chanutin ³³, a velocidade de migração da fração X está na dependência da concentração relativa da albumina, sendo em média 20% superior à desta última; a velocidade de migração de X_1 é de 8 a 14% superior à da fração X. Todas essas verificações foram obtidas pela eletroforese livre. Pela eletroforese em papel, Bücher, Matzelt e Pette ¹⁵ foram os primeiros a registrar a presença da *fração pré-albumínica*, designando-a como fração V. Desde

então ela vem sendo referida pela maioria dos autores, sendo utilizadas indiferentemente as designações de fração X, fração V, ou simplesmente pré-albumina; alguns pesquisadores separam duas frações de migração mais rápida que a albumina⁷⁰.

O teor da fração pré-albumina em triptofano e em tirosina é diferente do da albumina¹; por outro lado ela contém glico e lipoproteínas^{6,7}. As opiniões divergem quanto à correspondência desta fração encontrada no LCR com frações de migração mais rápida que a albumina¹ encontradas esporadicamente no soro sanguíneo^{14,48}; também é discutida sua relação com elementos semelhantes encontrados em outros líquidos orgânicos, como seja, por exemplo, o líquido sinovial⁵¹. A presença desta fração pré-albuminica tem sido usada como argumento para os que sustentam a teoria da origem local de proteínas do LCR¹⁰. O aumento da pré-albumina pode transparecer pelo aumento da proteinorraquia total, mas não influi no comportamento das reações coloidais.

Um ápice entre as globulinas β e γ , designado pela letra τ representando 3 a 8% da área total do perfil eletroforético foi primeiramente assinalado na EFP do LCR por Bücher, Matzelt e Pette¹⁵. A individualidade desta fração constitui um dos pontos mais controvertidos da eletroforese das proteínas do LCR, pois ela é dificilmente separável das duas outras frações adjacentes; enquanto que alguns a referem como fração individualizada, outros a consideram como subfração, ora da globulina β (β_2), ora da globulina γ (γ_1); para uns poucos pesquisadores ela representaria o fibrinogênio. Em 1957, sua existência como fração independente é ainda considerada problema aberto⁵⁹.

Uma outra fração — fração φ (fibrinogênio) — tem sido, aliás raramente, encontrada pela eletroforese livre³⁸; pela eletroforese em papel, a presença de mancha no local da distribuição do material na tira de papel tem sido atribuída a essa fração².

Há diferenças no teor relativo de cada fração protéica conforme o local em que fôr colhido o LCR. Trabalhando com casos normais, Steger⁶⁸ chamou a atenção para a maior concentração relativa da pré-albumina no LCR colhido por via ventricular que no obtido por punção lombar (em um dos casos 10 vezes maior: no LCR ventricular 22,2% e no lombar 2,1%), ocupando posição intermediária a concentração desta fração no LCR extraído por via cisternal. Em 200 casos cuja proteinorraquia não era superior a 50 mg por 100 ml, Bauer¹⁰ encontrou, para a concentração média da pré-albumina os valores de 15,4% para o LCR ventricular, de 4,5% para o cisternal e de 2,9% para o lombar. Kitamura e col.⁴¹ salientam o achado de taxa maior de γ -globulina e de albumina no LCR lombar. Schmidt e Matiar⁶³ encontraram aumento da percentagem relativa das globulinas do grupo médio (α_1 , β e τ) em sentido cranial (do LCR lombar para o cisternal).

VALOR DA ELETROFORESE PARA COMPLEMENTAÇÃO DOS DADOS
FORNECIDOS POR OUTROS MÉTODOS DE ESTUDO DAS PROTEÍNAS
DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO

O estudo eletroforético fornece dados que tornam possível levar o estudo qualitativo das proteínas do LCR além do que tinha sido conseguido pelos métodos anteriormente empregados.

Os resultados obtidos com o método eletroforético são diferentes daqueles encontrados, por exemplo, pelo método de precipitação fracionada de Kafka (sulfato de amônio em semi-saturação), segundo o qual a relação albumina/globulina (A/G) no LCR normal é elevada, pois que, pela eletroforese, a relação A/G do LCR é equivalente à do soro sanguíneo. Isto se dá porque, nos métodos de precipitação fracionada, o teor de globulina normalmente demonstrado no LCR é pequeno e, em consequência, a relação A/G tem valores elevados. Wallenius⁷² salientou os resultados de Carl Lange⁴⁶, mostrando que, na precipitação fracionada pelo sulfato de amônio, quanto mais baixa fôr a concentração protéica total (como ocorre no LCR normal), menor será, proporcionalmente, a quantidade das globulinas precipitadas, pois parte delas não se precipita, sendo incorporada à albumina. Steger⁶⁸ relaciona os pequenos valores obtidos com o método de Kafka com o fato de haver apenas precipitação da fração γ -globulina. A conclusão semelhante chegou Floden²⁶ comparando os resultados obtidos pela eletroforese em papel com os fornecidos pelo método de Izikowitz, considerado como o mais acurado dos processos aplicáveis ao LCR para precipitação fracionada das proteínas²⁷. Por outro lado, Tiselius⁶⁹ já mostrara que tanto a euglobulina como a pseudo-globulina do soro sanguíneo, precipitadas pelo sulfato de amônio, contêm os três componentes globulínicos separados pela eletroforese (α , β , γ).

A eletroforese permite demonstrar que, mesmo quando a relação A/G se mostre dentro de limites normais, podem estar presentes alterações no teor de uma ou mais frações globulínicas.

ELETROFORESE DAS PROTEÍNAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO
E REAÇÕES COLOIDAIS

O comportamento das *reações coloidais* — introduzidas e praticadas de modo empírico, mas de grande valor prático — já foi estudado frente a cada fração protéica separada pela eletroforese. Assim, sabe-se que a floculação coloidal resulta da interrelação entre a capacidade floculante e a ação inibidora das diversas frações; não há, por isso, relação direta entre o perfil eletroforético e a curva coloidal obtidos em determinado caso¹⁷. Kabat e col.³⁸ verificaram, para a reação do ouro coloidal, a capacidade floculante da γ -globulina e a ação inibidora da albumina. Sheid e Scheid^{61, 62}, frente à reação coloidal do mastique, estudaram os mesmos fenômenos,

mostrando que a albumina inibe a capacidade floculante das globulinas β e γ e que a floculação determinada por esta sofre efeito inibidor por parte da fração β ; a γ -globulina produz floculação nos tubos onde é menor a diluição do material e a β -globulina naqueles onde a diluição é mais alta. Vymazal e Hovorková⁷¹ verificaram que, para a reação do ouro coloidal, tanto a albumina como a globulina α_1 não produzem floculação e podem inibir a atividade das demais frações; a curva coloidal produzida pela γ -globulina predomina na zona esquerda, a de β -globulina na zona média e a de globulina α_2 na zona direita. Floculação mais intensa nesta última zona se observa com associação das globulinas α_2 e β ; associadas à γ -globulina, elas inibem a precipitação provocada por esta última até atingirem certa concentração, a partir da qual passam a agir em sentido contrário. Press⁵⁵ tomando como ponto de partida os estudos de McLagan e Bunn, estudou o comportamento das frações protéicas do LCR e soro sanguíneo frente à reação do ouro coloidal. A floculação produzida pela γ -globulina é inibida tanto pela albumina, como pelas globulinas α e β . As α -globulinas do LCR e do soro diferem quanto a esta propriedade porque a do soro tem capacidade de proteção menor, devido à presença de componente de sedimentação mais rápido, ausente na do LCR. O poder inibidor da albumina é 10 vezes menor que o da β -globulina. Um componente de sedimentação mais lenta faz parte das globulinas β e γ , principalmente desta última, o qual protege o colóide contra a floculação. Este componente (S) da γ -globulina explicaria a diferença entre o comportamento da γ -globulina do LCR normal e do soro, pois a primeira produz menor floculação que a última; em LCR cujas reações coloidais mostraram floculação à esquerda há diminuição desse componente S; as interrelações entre a quantidade deste componente e o total de γ -globulina são discutidas para explicar curvas diversas obtidas para concentrações semelhantes de γ -globulina.

Compreende-se, assim, como é difícil pressupor a quantidade relativa de cada fração, pela simples análise da curva coloidal, ou, ao contrário, conhecendo o teor relativo de cada fração, calcular qual seria a curva coloidal correspondente.

Terminando este apanhado geral, diremos que, como aconteceu em relação às proteínas do soro sanguíneo, a aplicação da eletroforese em papel de filtro no estudo das proteínas do LCR é igualmente promissora. Os dados até agora consignados na literatura permitem considerar este método como precioso para evidenciar alterações anteriormente ignoradas da composição protéica do LCR podendo fundamentar melhor as bases para o diagnóstico diferencial e, talvez, esclarecendo os mecanismos patogênicos de algumas afecções. Pode-se pressupor que, em certos casos, o estudo eletroforético seriado permitirá avaliar a marcha evolutiva ou regressiva de alguns processos patológicos. Além disso, este recurso laboratorial abre novos rumos no conhecimento das interrelações físico-químicas entre o líquido cefalorraquidiano e o sangue.

RESUMO

Os caracteres gerais do método eletroforético são apresentados de modo sumário, especialmente aquêles referentes à eletroforese em papel, no sentido de familiarizar o neurologista quanto aos seus aspectos principais e sua utilização no estudo das frações protéicas do líquido cefalorraquidiano cujos aspectos particulares são discutidos.

SUMMARY

Electrophoresis of cerebrospinal fluid proteins. General considerations on paper electrophoresis

The main aspects of electrophoresis are summarised, specially those concerning paper electrophoresis, as a practical guide for neurologists, in its appliance to the study of cerebrospinal fluid protein fractions.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALY, F. W. — Untersuchungen über die elektrophoretisch isolierte Vorfraktion aus Liquor cerebrospinalis. *Biochem. Zeitschrift.*, 325:505 (setembro, 2), 1954.
2. ANTONINI, F. M.; PIVA, G. — Il frazionamento elettroforetico delle proteine del liquido cerebro-spinale in condizioni normali e patologiche. *Settimana Medica*, 40: 455 (setembro, 15), 1952.
3. AZERAD, E.; LEWIN, J.; GHATA, J. — L'électrophorèse sur papier. *Presse Méd.*, 64:717 (abril, 18), 1956.
4. AYROSA GALVÃO, P. A.; HOXTER, G. — Eletroforese das proteínas do soro nas doenças hepáticas. *Rev. Hospital das Clínicas*, 12:153 (março-abril), 1957.
5. BAUDOUIN, A.; LEWIN, J.; HILLION, P. — Électrophorèse sur papier des protéines du liquide céphalorachidien. Étude des lipoprotéines. *C. R. Soc. Biol.*, 147:1036 (junho, 27), 1953.
6. BAUDOUIN, A.; LEWIN, J.; HILLION, P. — Électrophorèse sur papier du liquide céphalorachidien: étude des glycoprotéines. *C. R. Soc. Biol.*, 148:1033 (junho, 26), 1954.
7. BAUDOUIN, A.; LEWIN, J.; HILLION, P. — Les lipoprotéines du liquide céphalorachidien; composante lipoprotéinique de la fraction rapide X, protéine rapide du plasma. *C. R. Soc. Biol.*, 149:1093 (junho, 11), 1955.
8. BAUER, H. — Über die Bedeutung der Papier Elektrophorese des Liquors für die klinische Forschung. *Deut. Z. f. Nerven.*, 170:381 (setembro), 1953.
9. BAUER, H. — Papierelektrophoretische Darstellung der proteingebundenen Kohlenhydrate und Lipide des Liquors. *Klin. Wchns.*, 32:612 (julho, 1), 1954.
10. BAUER, H. — Zur Frage der Identität der Liquorproteine mit den Eiweisskörpern des Blutserums. Besonderheiten der Liquorproteine hinsichtlich der Vorfraktion der γ -globuline und der proteingebundenen Lipide. *Deut. Z. f. Nerven.*, 175:354 (novembro), 1956.
11. BOOIJ, J. — Electrophoresis in cerebrospinal fluid proteins. *Folia Psychiat., Neurol. et Neurochirurg. Neerlandica*, 52: 247, 1949.
12. BOOIJ, J. — Electrophoresis in cerebrospinal fluid proteins. *Folia Psychiat., Neurol. et Neurochirurg. Neerlandica*, 53:502, 1950.
13. BOOIJ, J. — Electrophoresis in cerebrospinal fluid proteins. The significance of the γ -globulin fraction in particular. *Folia Psychiat., Neurol. et Neurochirurg. Neerlandica*, 55:137, 1952.
14. BOOIJ, J. — A new component in the electrophoresis diagram of the serum of patients suffering from poliomyelitis acuta anterior. *Folia Psychiat., Neurol. et Neurochirurg. Neerlandica*, 56:191, 1953.
15. BUCHER, T.; MATZELT, D.; PETTE, D. — Papierelektropherogramm der Eiweisskörper des Liquor cerebrospinalis. *Naturwissenschaften*, 39:114 (março), 1952.
16. BUCHER, T.; MATZELT, D.; PETTE, D. — Papierelektrophorese von Liquor cerebrospinalis. *Klin. Wchnschr.*, 30:325, 1952.

- In* Zentralblatt ges. Neurol. u. Psychiat., 121:41 (janeiro), 1953. 17. CUMINGS, J. N. — The examination of the cerebrospinal fluid and cerebral cyst fluid by paper strip electrophoresis. *J. Neurol., Neurosurg. a. Psychiat.*, 16:152 (agosto), 1953. 18. EATON, J. C.; GARDNER, M. O. — Separation of cerebrospinal fluid proteins by paper electrophoresis. *Biochem. J.*, 55:25 (setembro), 1953. 19. ESSER, H.; HEINZLER, F. — Eine Methode zur Gewinnung der Proteine aus Liquor cerebrospinalis und anderen schwach Eiweisshaltigen Lösungen durch Filtration mit Überdruck für die Elektrophorese in Filterpapier. *Klin. Wehnschr.*, 30:600 (julho, 1), 1952. 20. ESSER, H. — Die Liquoreiweisskörper des Menschen. *Zentralblatt ges. Neurol. u. Psychiat.*, 122:68 (março), 1953. 21. ESSER, H. — Elektrophoretische Liquoreiweissuntersuchungen bei organischen Erkrankungen des Zentralnervensystems. *Zentralblatt ges. Neurol. u. Psychiat.*, 123:226 (junho), 1953. 22. EWERBECK, H. — Die Elektrophoretische Darstellung normalen menschlichen Liquors. *Klin. Wehnschr.*, 28:692 (outubro, 15), 1950. 23. FINE, J. M.; GROULADE, J.; SAINT-PAUL, M.; TIZZANI, R. J. — L'électrophorèse. Apport à la connaissance de la physiologie des protéines, glyco et lipoprotéines sériques chez l'homme et l'animal. *Biol. Méd.*, 45:591 (dezembro), 1956. 24. FINE, J. M.; VINÇON-ABRIQ, A. E.; GROULADE, J. — Contribution à l'étude électrophorétique du sérum au cours des maladies du sang et des organes hématopoïétiques. *Presse Méd.*, 62:1043 (julho, 7), 1954. 25. FISK, A. A.; CHANUTIN, A.; KLINGMAN, W. C. — Observations on a rapid migrating electrophoretic component of cerebrospinal fluid. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 78:1 (janeiro), 1951. 26. FLODEN, C. H. — Cerebrospinal fluid protein in syphilis. A methodological and clinical study, based on the Izikowitz method for fractional protein determination, and a comparison with paper electrophoretic protein determination. *Acta Dermato-Vereuol.*, suplemento 32, 1955, 184 págs. 27. FRANTZEN, E. — A survey of methods for the determination of protein fractions in the cerebrospinal fluid. *Acta Psychiat. et Neurol. Scandinavica*, 30:217 (março), 1955. 28. GRASSMANN, W. — General methods of paper electrophoresis with examples of its uses in medical and biochemical problems. *Symposium on Paper Electrophoresis*, J. & A. Churchill Ltd., Londres, 1956, págs. 2-21. 29. GRASSMANN, W.; HANNIG, K. — Beiträge zur Methodik der Papierelektrophoretischen Serumanalyse. *Klin. Wehnschr.*, 32:838 (setembro, 15), 1954. 30. GRIES, G.; ALY, F. W.; OLDERSHAUSEN, H. F. — Zur Methodik der Papierelektrophorese des Liquor Cerebrospinalis. *Klin. Wehnschr.*, 31:644 (julho, 15), 1953. 31. GROGAN, C. H.; ROBOZ, E. — Simple apparatus for concentrating biologic fluids of low protein content. *J. Laborat. a. Clin. Med.*, 45:495 (março), 1955. 32. HESSELVIK, L. — An electrophoretic study of normal and pathological body fluids. *Acta Med. Scandinavica*, 101:461, 1939. 33. HOCH, H.; CHANUTIN, A. — Electrophoretic studies on cerebrospinal fluid. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 81:628 (dezembro), 1952. 34. HOXTER, G. — Comunicação pessoal. 35. HOXTER, G.; WAJCHENBERG, B. L. — Eletroforese das proteínas plasmáticas. Generalidades e método. *Rev. Paulista de Med.*, 44:298 (abril), 1954. 36. HOXTER, G.; WAJCHENBERG, B. L. — Eletroforese das proteínas plasmáticas. Interpretação do traçado eletroforético do plasma humano normal e suas variações patológicas. *Rev. Paulista de Med.*, 44:316 (abril), 1954. 37. HOXTER, G.; WAJCHENBERG, B. L.; MUNGOLI, R. — Analysis of electrophoretic patterns. *Nature*, 179:423 (fevereiro, 23), 1957. 38. KABAT, E. A.; LANDOW, H.; MOORE, D. H. — Electrophoretic patterns of concentrated cerebrospinal fluid. *Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med.*, 49:260 (fevereiro), 1942. 39. KABAT, E. A.; MOORE, D. H.; LANDOW, H. — An electrophoretic study of the protein components in cerebrospinal fluid and their relationship to the serum proteins. *J. Clin. Invest.*, 21:571 (setembro), 1942. 40. KIKUCHI, J. — Electrophoretic analysis of protein in spinal fluid by meningitis. *Folia Psychiat. et Neurol. Japonica*, suplemento 2 (Proceedings XIV Annual Meeting of Japan Neurosurgical Society, 1955), págs. 3-4. 41. KITAMURA, K.; KATSUKI, T.; HARA, H. — Studies on protein in cerebrospinal fluid in neurosurgical diseases by paper-electrophoresis. *Folia Psychiat. et Neurol. Japonica*, suplemento 2 (Proceedings XIV Annual Meeting of Japan Neurosurgical Society, 1955), págs. 1-2. 42. KOIW, E.; WALLE-

- NIUS, G.; GRÖNWALL, A. — Paper electrophoresis in clinical chemistry. A comparison with Tiselius original method. *Scandinav. J. Clin. a. Laborat. Invest.*, 4:47, 1952. 43. KUNKEL, H. G.; TISELIUS, A. — Electrophoresis of proteins on filter paper. *J. Gen. Physiol.*, 35:89 (setembro, 20), 1951. 44. LABHART, H.; SCHWEIZER, W.; STAUB, H. — Mikroelektrophoretische Untersuchungen von normalen und pathologischen Liquor cerebrospinalis. *Confinia Neurol.*, 11:325, 1951. *In Excerpta Medica* (VIII), 5:425 (maio), 1952. 45. LACIGA, Z.; ZIDOVA, V. — The paper electrophoresis contribution to the determination of types of cerebrospinal fluid. *Formulae in nervous diseases. First Congress of Czechoslovak Neurologists. Jezenik-Lazne*, 8-13 outubro, 1956, págs. 18-19. 46. LANGE, C. — Interpretation of findings in the cerebrospinal fluid. The technique and systematic interpretation of the albumin-globulin ratio in cerebrospinal fluids. *J. Laborat. a. Clin. Med.*, 31:552 (maio), 1946. 47. LEDERER, M. — Introduction to Paper Electrophoresis and Related Methods. Elsevier Publish Co., Amsterdam, 1955, págs. 31-60. 48. LEWIN, J.; GHATA, J.; AZÉRAD, E. — Protéines rapides du sérum normal. *Presse Méd.*, 64:1433 (agosto, 25), 1956. 49. LEY, R. — Electrophoresigramme. *Acta Neurol. et Psychiat. Belgica*, 57:536 (junho), 1957. 50. MADEIRA, F. — Eletroforese em papel. *Gazeta Méd. Portuguesa*, 6:205 (janeiro-março), 1953. 51. MERKLEN, F. P.; MASSEYEFF, R. — L'adsorption d'albumine, cause d'erreur dans l'appréciation quantitative des protéines sériques dans l'électrophorèse sur papier filtre. *C. R. Soc. Biol.*, 146:1905 (dezembro, 13), 1952. 52. MIES, H. J. — Einengung von Liquor cerebrospinalis als Verbeiterung zur Papierelektrophorese. *Klin. Wchnschr.*, 31:159 (fevereiro, 15), 1953. 53. PETERS, H. J. — Paper electrophoresis of cerebrospinal fluid. *Chem. Weekblad*, 49:248. *In Chem. Abstracts*, 47:8171 (agosto, 10 a outubro, 25), 1953. 54. PIEPER, J. — Über die Besonderen Eiweißfraktionen des Liquor cerebrospinalis. *Klin. Wchnschr.*, 32:597 (julho, 1), 1954. 55. PRESS, E. M. — A comparative study of cerebrospinal fluid and serum proteins in multiple sclerosis with special reference to the Lange colloidal gold reaction. *Biochem. J.*, 63:367 (julho), 1956. 56. PRUCKNER, F.; SCHWUTTKE, G. — Methode zur Einengung des Liquor cerebrospinalis zur Herstellung von Elektropherogrammen. *Arch. Psychiat. u. Z. Neurol.*, 193:48 (fevereiro, 24), 1955. 57. ROBOZ, E.; HESS, W. C.; TEMPLE, D. M.; WASHINGTON, M. S. — Paper electrophoretic estimation of protein in cerebrospinal fluid. *J. Laborat. a. Clin. Med.*, 43:785 (maio), 1954. 58. RODRIGUES, E.; RIBEIRO, L. P. — Montagem simples para eletroforese em papel para uso em laboratórios clínicos. *O Hospital*, 46:611 (dezembro), 1954. 59. SANDE, M. van; LOEWENTHAL, A.; KARCHER, D. — Interêt clinique des électrophorésigrammes des protéines du liquide céphalo-rachidien. *Acta Neurol. et Psychiat. Belgica*, 57:523 (junho), 1957. 60. SCHEID, K. F.; SCHEID, L. — Studies of the pathological physiology of cerebrospinal fluid. Electrophoretic separation of the proteins of the cerebrospinal fluid in inflammatory diseases of nervous system: a contribution to the pathological physiology of meningeal and cerebral blood vessels. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 117:219, 1944. *In Chem. Abstracts*, 43:9234 (setembro, 10 a novembro, 25), 1949. 61. SCHEID, K. F.; SCHEID, L. — Studies of the pathological physiology of cerebrospinal fluid. The colloidal chemical mechanism and pathophysiological significance of the mastic reaction and a modification thereof. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 118:316, 1948. *In Chem. Abstracts*, 43:3876 (março, 25), 1949. 62. SCHEID, K. F.; SCHEID, L.; SCHNEIDT, W. — Studies of the pathological physiology of cerebrospinal fluid. Comparative investigations of the colloid reactions, their colloidal chemical mechanism and their practical use in diagnosis. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 118:337, 1948. *In Chem. Abstracts*, 43:3877 (março, 25), 1949. 63. SCHMIDT, C.; MATIAR, H. — Das quantitative Verhältnis der Serum und Liquor-proteine. *Dtsch. Z. f. Nervenheilk.*, 174:443 (abril), 1956. 64. SCHÖNENBERG, H. — Die Papier-Elektrophorese des Liquor cerebrospinalis. *Annales Paediatrici (Basiléia)*, 183:309 (novembro), 1954. 65. SMITH, J. K.; GERSTL, B.; DAVIS, W. E.; ORTH, D. L. — Lipoprotein patterns of spinal fluid obtained by paper electrophoresis. *Arch. Neurol. a. Psychiat.*, 76:608 (dezembro), 1956. 66. SOMMERFELT, S. C. — Reproducibility with paper electrophoresis of serum proteins. *Scandinav. J. Clin. a. Laborat. Invest.*, 4:307, 1952. 67. SOMMERFELT, S. C. —

Some practical points regarding the reading of the paper electrophoretic strip. Symposium on Paper Electrophoresis, J. & A. Churchill Ltd., Londres, 1956, págs. 151-159. 68. STEGER, J. — Elektrophoretische Untersuchungen des Liquors. Dtsch. Z. f. Nervenheilk., 171:1 (novembro), 1953. 69. TISELIUS, A. — Electrophoresis of serum globulin. Electrophoresis analysis of normal and immune sera. Biochem. J., 31:1464, 1937. 70. TONINI, G.; INESI, G.; RISIO, C. de — Considerazione tecniche e metodologiche in campo di elettroforesi delle proteine liquorali. G. di Psiquiat. e di Neuropatol., 85:203, 1957. 71. VYMAZAL, J.; HOVORKOVA, B. — A contribution to the theory of the colloidal gold reaction. Ceskolovenská Neurologie, 19:207 (setembro), 1956. 72. WALLENIUS, G. — Electrophoretic patterns of cerebrospinal fluid and serum compared in normal and pathological conditions. Acta Societ. Med. Upsalliensis, 57:138 (junho, 20), 1952.

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