

# PROTEINOGRAMA DO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO NA NEUROPATIA DIABÉTICA

A. SPINA-FRANÇA \*

HORACIO M. CANELAS \*\*

Madonick e Margolis<sup>10</sup> analisaram o comportamento da concentração protéica do líquido cefalorraqueano (LCR) em 100 pacientes diabéticos. Verificaram que não há dependência entre proteinorraquia e glicemia ou proteinemia. O aumento da proteinorraquia foi observado apenas nos casos mais graves de diabetes mellitus, acompanhados de acometimento do sistema nervoso.

Entre as complicações do diabetes mellitus, a neuropatia diabética (ND) é a que se acompanha de hiperproteinorraquia com maior frequência<sup>11</sup>. Embora o aumento da concentração protéica seja comum na ND, não costuma atingir cifras elevadas; Rundles<sup>14</sup> refere que estas são encontradas ocasionalmente.

A natureza e a origem da hiperproteinorraquia encontrada na ND são problemas ainda incompletamente resolvidos. Neste trabalho são analisados os dados referentes ao proteinograma do LCR de uma série de pacientes com ND, no sentido de contribuir para o estudo desse problema.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foi estudado o proteinograma do LCR de 22 pacientes com neuropatia diabética.

Os pacientes foram acompanhados na Unidade de Diabetes da 1ª Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Para cada caso foi analisado o proteinograma de uma amostra de LCR lombar. Em 17 deles foi também analisado na ocasião o proteinograma do soro sanguíneo (soro). Parte da amostra de LCR estudada foi submetida a exame citológico e a exame imunológico (reações de fixação do complemento para sífilis e para cisticercose).

O exame citológico do LCR foi realizado e interpretado segundo a padronização adotada em nosso meio<sup>9</sup>. As reações imunológicas foram feitas segundo a técnica de Kolmer<sup>7</sup>. A concentração protéica total do LCR foi determinada pelo método turbidimétrico do ácido tricloracético<sup>17</sup>; e a do sangue pelo do biureto<sup>7</sup>. O estudo das frações protéicas do LCR e do soro foi feito pela eletroforese em papel, segundo

---

Trabalho da Clínica Neurológica (Prof. Adherbal P. M. Tolosa) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: \* Assistente-doutor; \*\* Professor-assistente.

Nº	SN	LCR										Sôro			
		T	Frações (%)							T	Frações (%)				
			PA	A	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$	A		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$	
1	57	1,5	54,0	4,0	6,5	24,0	10,0	8,3	53,5	3,0	8,5	9,5	25,5		
2	123	0	53,5	3,5	8,5	25,0	9,5	7,9	34,0	3,5	12,0	17,5	33,0		
3	62	1,0	56,0	4,0	5,0	23,0	11,0	7,2	41,5	6,0	9,5	12,0	31,0		
4	92	4,0	52,0	6,0	7,5	19,5	11,0								
5	37	2,0	42,0	7,0	9,0	24,0	16,0	8,0	46,5	4,5	12,5	15,0	21,5		
6	113	4,0	36,0	7,0	10,0	27,0	16,0	8,1	50,0	4,0	7,5	15,0	23,5		
7	26	2,5	53,5	4,5	6,5	22,5	10,5	8,3	51,0	5,0	8,0	14,5	21,5		
8	45	3,0	55,0	4,0	8,0	21,0	9,0								
9	8	5,0	54,0	4,0	7,0	16,0	14,0	8,2	49,0	4,5	13,5	13,0	20,0		
10	129	2,0	59,5	3,5	7,0	19,0	9,0								
11	52	1,0	55,0	7,0	8,0	19,5	9,5	8,0	48,5	4,0	9,5	15,5	22,5		
12	56	3,5	50,0	5,0	7,5	25,0	9,0	7,2	45,0	6,0	11,5	16,0	21,5		
13	64	2,3	4,0	4,0	49,0	5,5	7,0								
14	90	1,0	49,5	5,0	7,0	27,0	10,0								
15	91	4,5	65,0	3,5	6,0	14,0	7,0	7,2	44,0	5,0	9,0	13,0	29,0		
16	107	2,0	52,0	5,0	9,0	22,0	10,0	7,2	44,0	7,0	12,5	17,5	19,0		
17	103	1,5	53,0	9,0	9,5	19,0	8,0	7,7	48,5	7,0	17,0	10,0	17,5		
18	115	1,0	52,0	4,5	7,5	26,0	9,0	7,8	49,0	3,0	10,0	18,0	20,0		
19	97	1,5	55,5	5,0	6,0	22,0	10,0	7,5	42,0	5,0	13,5	16,5	23,0		
20	40	2,0	64,0	3,0	5,0	17,0	9,0	7,7	54,0	4,0	9,0	15,0	18,0		
21	87	0	63,0	3,0	7,5	18,5	8,0	7,9	54,0	2,5	10,5	13,5	19,5		
22	37	3,0	54,5	4,5	6,5	21,5	10,0	7,2	50,5	4,0	9,0	15,5	21,0		

Tabela 1 — Resultados obtidos na avaliação da sintomatologia neurológica (SN) e na determinação das proteínas do líquido cefalorraquiano (LCR) e do soro sanguíneo (sôro) dos 22 casos estudados. As proteínas totais (T) são referidas em mg/100 ml para o LCR e em g/100 ml para o soro. Para as frações protéicas, estudadas no LCR e no soro por eletroforese em papel, é referida sua participação percentual no perfil eletroforético (PA, pré-albumina; A, albumina; globulinas  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ).

técnica descrita<sup>15</sup>, e os resultados obtidos foram interpretados segundo os padrões normais estabelecidos para essa técnica<sup>16</sup>.

A sintomatologia neurológica foi avaliada de modo semiquantitativo, segundo tabela proposta por Alexander<sup>1</sup> e modificada por Canelas e col.<sup>5</sup>. A sensibilidade vibratória (frequente e precocemente alterada na neuropatia diabética<sup>4</sup>) foi medida com palestesiômetro eletromagnético\*; os valores obtidos (em volts) foram submetidos às conversões logarítmica e etária propostas por Mirsky e col.<sup>12</sup>, sendo o índice de hipopalestesia referido pela elevação da soma dos limiares nos anulares e há-luces<sup>2</sup>, multiplicada pelo fator de uniformização 10. Os cálculos totais de cada paciente foram correlacionados com as concentrações de cada fração protéica do LCR e com o total respectivo.

## RESULTADOS

Em todas as amostras de LCR analisadas o número de células era normal e as reações imunológicas foram negativas.

São apresentados, na tabela 1, os resultados referentes à avaliação semiquantitativa do exame neurológico e ao estudo das proteínas totais e frações do LCR e do soro.

*Proteinograma do LCR* — Em relação aos valores normais<sup>17</sup> para a proteinorraquia total em nível lombar (média 24,0 mg/100 ml  $\pm$  6,3) verifica-se que houve aumento da concentração protéica total do LCR em 7 dos 22 casos estudados. Os aumentos encontrados foram discretos, sendo de 53 mg/100 ml a maior cifra registrada. A diferença entre a média normal e a encontrada em nossos casos de ND (35,3 mg/100 ml  $\pm$  8,9) foi altamente significativa ( $t = 7,92$ ;  $P < 0,001$ ).

Em todos os casos de ND o perfil eletroforético das proteínas do LCR era do tipo encontrado no LCR em condições normais; assim, a albumina representou, em todos, a maior das frações; entre as globulinas predominavam as do grupo  $\beta$ .

Pequenas alterações quanto ao teor de cada uma das frações foram registradas: em 2 casos a pré-albumina não foi encontrada; havia diminuição da percentagem de albumina em 2 pacientes (casos 5 e 6) e aumento em 3 (casos 15, 20 e 21). O teor relativo da globulina  $\alpha_1$  estava aumentado em um paciente (caso 17), o das globulinas  $\beta$  estava diminuído em um (caso 15) e o de globulina  $\gamma$ , aumentado em 3 casos (5, 6 e 9). Por serem discretas, essas alterações não provocaram modificações do conjunto do perfil eletroforético das proteínas do LCR. Igualmente, o perfil não sofreu alterações em função da intensidade da proteinorraquia total, conforme se verifica agrupando os resultados segundo a proteinorraquia estivesse entre 21 e 30, entre 31 e 40 e entre 41 e 53 mg/100 ml (tabela 2).

*Proteinograma do soro* — Para 20 pessoas sadias englobadas na análise feita em publicação anterior<sup>18</sup> a média da proteinemia total correspondeu a 7,29 g/100 ml  $\pm$  0,66. A proteinemia total nos casos de ND estudados é representada pela média de 7,73 g/100 ml  $\pm$  0,41. A diferença entre essas médias é significativa ( $t = 2,44$ ;  $P \simeq 0,02$ ).

A separação das frações protéicas do soro por eletroforese em papel permitiu estabelecer, para o grupo de pessoas sadias referido, os valores médios seguintes: 3,99 g/100 ml para a albumina e, para a globulina  $\alpha_1$ , 0,29, para  $\alpha_2$ , 0,67, para  $\beta$ , 0,97 e para  $\gamma$ , 1,36. Os valores médios encontrados para o soro dos pacientes com ND

\* *Bio-thesiometer*, Bio-Medical Instruments Co., Newbury, Ohio, E.U.A.

Proteínas totais	n	Pré- albumina	Albumina	Globulinas			
				$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
21-30	9	2,9	53,1	4,6	7,1	19,6	10,5
31-40	6	1,2	55,3	4,2	7,3	21,7	10,2
41-50	7	2,4	52,7	5,9	7,6	21,1	10,2

Tabela 2 — Percentuais médios representativos das frações protéicas do LCR, agrupando os pacientes estudados segundo a taxa de proteínas totais (mg/100 ml) do LCR. Legenda: n, número de casos.

foram: para a albumina 3,65 g/100 ml e, para a globulina  $\alpha_1$  0,35, para  $\alpha_2$  0,83, para  $\beta$  1,15 e para  $\gamma$  1,76. A relação entre os valores médios referentes aos pacientes com ND e às pessoas sadias é representada por valores superiores à unidade para as globulinas ( $\alpha_1$  1,21;  $\alpha_2$  1,24;  $\beta$  1,15;  $\gamma$  1,29), enquanto para a albumina essa relação corresponde a 0,91. Estes dados mostram que o aumento da proteinemia total verificado em nossos casos era devido à maior concentração das globulinas no soro. A frequência em que ocorreram esses aumentos é ilustrada no gráfico 1.

Frações	Albumina	Globulinas			
		$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\beta$	$\gamma$
Média normal	000000	000000 000000	0 000000 000000	0 000000 000000	0000 000000 000000
	000000 000000	000000	0000	0000	0

Gráfico 1 — Distribuição em relação ao normal das concentrações das frações protéicas do soro, referentes aos 17 casos em que foram estudadas.

Correlação entre a concentração protéica total do LCR e do soro — A exploração da correlação entre as taxas de proteínas totais no LCR e no soro para os 17 casos em que ambas foram estudadas mostrou-se não significativa ( $r = +0,054$ ).

Relação entre o perfil eletroforético do LCR e do soro — Em condições normais, a relação entre o perfil protéico do LCR e do soro respectivo é definida pela unidade para a albumina e para as globulinas  $\alpha$  e é representada pelos valores médios de 1,7 e de 0,5 para as globulinas  $\beta$  e  $\gamma$ , respectivamente. Nos casos de ND estudados foi verificado comportamento diferente. A porcentagem de albumina do LCR, na maioria das vezes, era maior que no sangue, determinando aumento da relação LCR/soro. Tendência inversa foi verificada em relação ao normal quanto

às globulinas; na maioria dos casos a relação estava diminuída, por aumento da respectiva percentagem no soro (gráfico 2).

Relação LCR/soro	Albumina	Globulinas		
		$\alpha$	$\beta$	$\gamma$
Média normal	ooo oooooo oooooo	oo	ooo	ooooo
	oo	oooooo oooooo ooo	oooooo oooooo oo	oooooo oooooo

Gráfico 2 — Relação LCR/soro. Distribuição dos 17 casos em que o LCR e o soro foram estudados em relação aos valores médios normais.

Relação entre as concentrações protéicas do LCR e a avaliação semiquantitativa da sintomatologia neurológica — No material estudado não foi demonstrada correlação estatisticamente significativa entre os dados analisados (tabela 3). Entretanto, os valores obtidos sugerem: correlação da proteinorraquia total com a sintomatologia; dentre as frações protéicas, maior participação da globulina  $\beta$  nessa correlação.

Estatísticas	$r$	$t_r$	$P$
LCR			
Proteínas totais	+0,292	1,365	0,18
Albumina	+0,230	1,055	0,30
Globulinas $\alpha$	+0,297	1,390	0,17
Globulinas $\beta$	+0,350	1,671	0,11
Globulinas $\gamma$	+0,052	0,232	0,80

Tabela 3 — Correlação entre a sintomatologia neurológica global e as proteínas do líquido cefalorraqueano.

#### COMENTÁRIOS

O estudo dos casos reunidos nesta publicação confirma que é comum ocorrer dissociação proteinocitológica no LCR de pacientes com neuropatia diabética. Assim, em 7 casos foi verificada hiperproteinorraquia; esses casos representam 32% do total de pacientes estudados, frequência pouco inferior à referida por Martin<sup>11</sup> em relação a seu material (38,5%). Por outro lado, os dados encontrados confirmam que o aumento da concentração pro-

têica do LCR na ND costuma ser discreto; a maior taxa encontrada foi de 53 mg/100 ml. Em seu conjunto, a proteinorraquia total dos casos estudados é representada pela média de 35,3 mg/100 ml  $\pm$  8,9. A diferença entre êste valor e a média normal é altamente significativa.

Na neuropatia diabética o aumento da proteinorraquia total não se acompanha de alterações especiais das diversas frações protéicas do LCR. Assim, o perfil eletroforético foi em todos os casos do tipo encontrado para o LCR normal. Em média, a participação das frações protéicas do LCR no perfil eletroforético se mostrou praticamente a mesma tanto entre casos com proteinorraquia total normal como entre aqueles em que ela estava aumentada.

As ocasionais alterações referidas para o teor de frações protéicas do LCR foram discretas, não determinando alterações do perfil eletroforético. Hammack e col.<sup>6</sup> referem achados semelhantes em pacientes com neuropatia diabética; contudo, não apresentaram dados numéricos que permitam avaliar a freqüência, a natureza e a intensidade do aumento de globulina  $\gamma$  a que acenam. Quando êste ocorreu, em nossa série de casos, foi discreto.

Não foi estatisticamente significativa a correlação entre a concentração protéica do LCR e do sôro. Êsse dado confirma a conclusão de Madonick e col.<sup>10</sup> sôbre o assunto. Igualmente não foi encontrada relação entre os perfis eletroforéticos das proteínas do LCR e do sôro. As alterações verificadas em relação a êste último não transpareceram no LCR, do que resultaram alterações das relações normalmente observadas entre os teores das frações protéicas no LCR e no sôro.

A interdependência da sintomatologia neurológica e da concentração protéica do LCR tem sido explorada por vários autores. Martin<sup>11</sup> e Plum<sup>13</sup> não observaram correlação entre ambas. Canelas e col.<sup>4</sup>, para 28 diabéticos, verificaram que a média da proteinorraquia do grupo com sintomatologia neurológica mais grave era significativamente maior que a do grupo com sinais de comprometimento moderado do sistema nervoso. Posteriormente<sup>3</sup>, em 40 pacientes com diabetes mellitus, a correlação entre a sintomatologia neurológica global, avaliada semiquantitativamente, e a proteinorraquia total mostrou-se significativa. Adotando o mesmo método de pesquisa para a presente série de casos de ND, não foi possível confirmar a existência de correlação significativa entre a concentração protéica total do LCR ou de cada uma das respectivas frações e o resultado da avaliação semiquantitativa de sintomatologia neurológica. Êste achado pode resultar do fato de o número de casos analisados nesta série ser menor. Pode resultar também da existência de correlação entre os dados referentes à proteinorraquia e um outro fator. A êste outro fator é que na realidade estaria correlacionada também a sintomatologia neurológica. Por coincidência, nessas condições, seria possível demonstrar correlação entre a sintomatologia e a proteinorraquia total em dada amostragem. A favor desta última hipótese deve ser lembrado que o valor da correlação encontrado para a série de casos anteriormente analisada<sup>3</sup>, embora estatisticamente significativo, era baixo ( $r = +0,462$ ).

Kutt e col.<sup>8</sup>, estudando por meio de eletroforese em gel de amido (técnica de Smithies) as proteínas do LCR em 78 pacientes diabéticos, verificaram aumento da globulina  $\alpha_2$ -s ("slow alpha-2 globulin"). Esta globulina é um dos componentes das globulinas do grupo  $\alpha_2$  e não se isola das demais por eletroforese em papel. Sua presença no LCR normal é demonstrável, mas só é evidente quando ocorrem distúrbios da barreira hemoliquórica. Os autores referidos verificaram que o aumento dessa subfração no LCR foi mais evidente entre os pacientes com lesões vasculares mais severas, não guardando correlação com a hiperproteínoorraquia e a intensidade ou o tipo de lesão do sistema nervoso.

Os dados referentes aos casos de neuropatia diabética aqui estudados encaminham no mesmo sentido as conclusões. Conforme foi analisado nos parágrafos anteriores, a hiperproteínoorraquia não mostrou dependência direta com as alterações do proteinograma do soro e com a sintomatologia neurológica. Ela pode, entretanto, estar na dependência de alterações vasculares. Estas acarretariam um aumento da passagem de proteínas do sangue para o LCR, inespecífica em relação a cada fração protéica. Como resultado, haveria aumento da concentração protéica total do LCR sem que se produzissem alterações do perfil eletroforético, conforme se verificou na série de casos estudados. Lesões mais acentuadas poderiam acarretar distúrbios maiores na passagem de uma ou outra fração protéica, sem alterar sobremodo o perfil eletroforético. Estes distúrbios referentes a frações isoladas apresentariam aspectos peculiares a cada caso; entre eles se encontram as alterações citadas da literatura e de alguns dos casos desta série.

#### RESUMO

Tendo como objetivo analisar a hiperproteínoorraquia que ocorre na neuropatia diabética, foi estudado o proteinograma do LCR de 22 pacientes portadores dessa afecção. Para fins comparativos, em 17 deles foi feito na mesma ocasião o estudo do proteinograma do soro. A sintomatologia neurológica foi avaliada de modo semiquantitativo.

Foi verificado aumento discreto da concentração protéica total do LCR em 7 casos (32%). O perfil eletroforético (eletroforese em papel) das proteínas foi do tipo encontrado no LCR normal, em todos os casos. Discretas alterações quanto ao teor de uma ou outra fração foram registradas. O perfil protéico não apresentava particularidades relacionadas ao fato de ser normal ou aumentada a concentração protéica total do LCR.

A relação entre a percentagem no LCR e no soro de cada uma das frações mostrou alterações do balanço protéico entre LCR e soro. As alterações eram devidas a modificações globulínicas do proteinograma do soro. Não foi encontrada correlação significativa entre a concentração protéica do LCR e a do soro.

O resultado da avaliação semiquantitativa da sintomatologia neurológica de cada caso foi correlacionado à concentração protéica total e de cada fração protéica do LCR. Não foi demonstrada correlação estatisticamente

significante entre os dados analisados. Entretanto, os valores obtidos sugerem: correlação da proteinorraquia total com a sintomatologia neurológica; dentre as frações protéicas, maior participação da globulina  $\beta$  nessa correlação.

Em vista dos resultados obtidos para os casos estudados, os autores consideram que o aumento da proteinorraquia total na neuropatia diabética não pode ser pôsto na dependência de alterações peculiares a uma ou outra fração protéica do LCR. Igualmente, não depende de modificações do proteinograma do sôro e não pode ser explicado em função direta da intensidade do quadro neurológico.

É discutida a possibilidade de estar a hiperproteinorraquia relacionada às alterações da barreira hemoliquórica, secundárias às lesões vasculares que acompanham o diabetes mellitus.

#### SUMMARY

##### *Cerebrospinal fluid proteins and their electrophoretic pattern in diabetic neuropathy.*

The present study was carried out in order to investigate the nature of the increase in the cerebrospinal fluid (CSF) protein content described in diabetic neuropathy. The CSF proteins were studied in 22 patients with clinical signs of diabetic neuropathy.

The total protein content and the electrophoretic pattern (paper electrophoresis) of the proteins were studied in one CSF sample of each patient. The CSF sample was collected through lumbar puncture. For comparative purposes, the total protein content and the electrophoretic pattern of the blood serum proteins were determined in 17 patients. For the same purpose the impairment of the nervous system was evaluated in a semi-quantitative way.

The CSF protein concentration was increased in 7 cases (32%). The increases were slight. The electrophoretic patterns were found to be similar to those found in normal conditions. The relative values found for each of the protein fractions were increased in some instances. Such increases were slight and did not change the protein pattern of the CSF. Among these changes, that regarding the  $\gamma$ -globulin was observed in 3 cases.

The CSF protein pattern did not show changes related to the total protein content of the sample. Changes in the serum protein pattern did not induce changes in the CSF protein pattern. The correlation between the total protein content of CSF and serum was not statistically significant.

In the cases studied no statistically significant correlation between the degree of neurological involvement and the CSF proteins was found. However, the data suggest a trend to correlation between the neurological picture and the total protein content of the CSF, particularly with  $\beta$ -globulin.



The results show that the increase in the total protein content of the CSF in diabetic neuropathy is not related to changes regarding one or more of the protein fractions of CSF. It is not dependent also on the protein concentration in the blood serum and/or the changes found in its protein pattern. The degree of the nervous impairment in itself cannot be directly related to the increase in the CSF proteins.

The importance of damage in the blood-CSF barrier is pointed out by data of the literature concerning the protein fractions in diabetic patients. Such damage cannot be excluded in the discussion of the results found. Its presence would enhance the passage of proteins to the CSF, thus resulting an increase in the total protein content. Changes in the protein pattern in such conditions are absent or slight, as it was found in the cases studied.

#### REFERENCIAS

1. ALEXANDER, L. — New concept of critical steps in the course of chronic debilitating neurologic disease in evaluation of therapeutic response. *Arch. Neurol. a. Psychiat.* (Chicago) 66:253-271, 1951.
2. CANELAS, H. M. — Sensibilidade vibratória: valor semiótico em algumas afecções do sistema nervoso. *Arq. Neuro-psiquiat.* (São Paulo) 16:275-352, 1958.
3. CANELAS, H. M. — Neuropatia diabética. *Rev. Paul. Med.*, 62:29-42, 1963.
4. CANELAS, H. M.; EPPS, D. R.; FERRAZ, E. C. F.; TEIXEIRA-PINTO, J. — Neuropatia diabética: considerações sobre 33 casos. *Rev. Paul. Med.*, 49:169-190, 1956.
5. CANELAS, H. M.; JAMRA, M. A. — Estudo comparativo dos efeitos hematológicos e neurológicos do extrato hepático, ácido fólico e vitamina B<sub>12</sub> no tratamento da anemia perniciosa de Addison-Biermer. *Arq. Neuro-psiquiat.* (São Paulo) 11:229-246, 1953.
6. HAMMACK, W. R.; STARNES, W. R.; HILL Jr., S. R. — Studies on the spinal fluid and serum protein electrophoretic pattern in patients with diabetes mellitus. *J. clin. Invest.*, 36:897, 1957.
7. KOLMER, J. A.; SPAULDING, E. H.; ROBINSON, H. W. — *Approved Laboratory Technic*, 5ª ed., Appleton-Century-Crofts Inc., New York, 1951.
8. KUTT, H.; HURWITZ, L. J.; GINSBURG, S. M.; McDOWELL, F. — Cerebrospinal fluid protein in diabetes mellitus. *Arch. Neurol.* (Chicago) 4:31-36, 1961.
9. LANGE, O. — O Líquido Céfaloraquidiano em Clínica. *Cia. Melhoramentos de São Paulo*, São Paulo, 1938.
10. MADONICK, M. J.; MARGOLIS, J. — Protein content of spinal fluid in diabetes mellitus. *Arch. Neurol. a. Psychiat.* (Chicago) 68:641-644, 1952.
11. MARTIN, M. M. — Diabetic neuropathy: a clinical study of 150 cases. *Brain* 76:594-624, 1953.
12. MIRSKY, I. A.; FUTTERMAN, P.; BROH-KAHN, R. H. — The quantitative measurement of vibratory perception in subjects with and without diabetes mellitus. *J. Lab. clin. Med.*, 41: 221-235, 1953.
13. PLUM, F. — The neurologic complications of diabetes mellitus. *In* Williams, R. H. — *Diabetes*. P. Hoeber, New York, 1960, págs. 602-622.
14. RUNDLES, R. W. — Diabetic neuropathy: general review with report of 125 cases. *Medicine* 24:111-160, 1945.
15. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese em papel das proteínas do líquido cefalorraquidiano. III: Técnica. *Arq. Neuro-psiquiat.* (São Paulo) 16:236-242, 1958.
16. SPINA-FRANÇA, A. — Eletroforese em papel das proteínas do líquido cefalorraquidiano. IV: Valores normais. *Arq. Neuro-psiquiat.* (São Paulo) 18:19-28, 1960.
17. SPINA-FRANÇA, A.; AMAR, I. — Valores normais da concentração protéica do líquido cefalorraquidiano: variações ligadas ao local da colheita da amostra. *Arq. Neuro-psiquiat.* (São Paulo) 19:220-225, 1961.