

VALORES NORMAIS DA CONCENTRAÇÃO PROTÉICA DO LÍQUIDO CÉFALORRAQUIDIANO CISTERNAL

A. SPINA-FRANÇA *
ISAAC AMAR **

A taxa considerada normal para a proteinorraquia e suas variações fisiológicas diferem de autor para autor. As diferenças decorrem do método utilizado na dosagem e do modo pelo qual é conceituada a normalidade.

A determinação exata da proteinorraquia constitui problema ainda não resolvido do ponto de vista prático. É questão pacífica a precisão do método de Kjeldahl; as dificuldades e o longo tempo requerido para sua execução impossibilitam seu emprêgo rotineiro; sua utilização é reservada para a determinação das taxas que servem de base para a análise de métodos tecnicamente mais simples. O grande número destes demonstra a pouca exatidão que oferecem; novos métodos são descritos com freqüência, chamando os autores que os introduzem a atenção para eles quer pela facilidade de sua execução, quer pelo maior critério dos resultados. Estudos comparativos entre tais métodos são comuns; o mesmo que, para um autor, apresentara precisão satisfatória, nas mãos de outro, comportava-se de modo diverso, como exemplifica Frantzen em sua criteriosa revisão ⁵.

A persistência do emprêgo de determinados métodos tem mostrado sua suficiência prática; outros, têm sido postos de lado, progressivamente. Assim, os volumétricos, preconizados no passado ¹¹, especialmente após os estudos de Kafka, vêm-se mostrando de precisão menor frente a novos métodos. Atualmente ainda, mostram-se satisfatórios para o emprêgo clínico, desde que utilizados criteriosamente ¹⁰ pois variações grandes nas taxas obtidas decorrem, muitas vezes, de condições imperfeitas de técnica ⁶.

O desenvolvimento dos métodos fotométricos — turbidimétricos ou colorimétricos — veio trazer grande número de técnicas, cada qual com taxas normais dentro de limites próprios, muitas vezes muito díspares, introduzindo confusão nos dados da literatura. Esta é nitida particularmente em referências a exames de líquido céfalo-raquidiano (LCR) registrados como parte da documentação clínica, cujos valores normais ou o método utilizado na dosagem não são mencionados.

Trabalho da Clínica Neurológica (Prof. A. Tolosa) e da Secção de Líquido Céfalorraquidiano do Laboratório Central (Dr. O. A. Germeck) do Hospital das Clínicas da Fac. de Med. da Univ. de São Paulo: * Assistente extranumerário; ** Acadêmico estagiário.

O entusiasmo inicial quanto à precisão do método do ácido sulfossilicílico⁴ de Denis e Ayer ou variantes foi encontrando restrições progressivas. Entre outros, Bossak e col.² demonstraram a influência da concentração relativa de albumina e globulinas sobre a concentração total, suficiente para falsear os resultados; Bauer e Angelstein¹ concluem por ser o merecedor de menor confiança entre os que estudaram.

Por outro lado, dos métodos colorimétricos, tem merecido aceitação várias modificações da técnica da reação do biureto de Weichselbaum. Apresentam, entretanto, o inconveniente de oferecer limites muito amplos para a normalidade, prejudicando a avaliação de aumentos discretos. Estes, talvez decorram do fato de reagir o biureto também com compostos de pequeno número de cadeias polipeptídicas dando resultados falsamente elevados¹ e da influência do erro instrumental efetivo em relação às pequenas concentrações¹³.

A precipitação protéica pelo ácido tricloracético, preconizada para sua dosagem desde os primeiros estudos sobre a química do LCR, foi adaptada para análise turbidimétrica por Bossak, Rosenberg e Harris². Estes autores demonstraram que relações albumina-globulina diversas, produzidas experimentalmente, não determinam variações apreciáveis na taxa total; variações da temperatura podem alterar, tendo sido fixada aquela na qual os resultados apresentam menor variação⁹.

Este método, conhecido por "método do V. D. R. L.", mostrou-se superior aos métodos colorimétricos do biureto e do ácido nítrico e ao turbidimétrico do ácido sulfossilicílico¹³. A superioridade foi explicada especialmente pela pequena influência do erro instrumental efetivo sobre concentrações correspondentes às habitualmente referidas como normais pois a transmissão correspondente a tais concentrações era inferior ao limite máximo de fidelidade do aparelho utilizado, o espectrofotômetro Coleman.

Com base nessas conclusões e nas dos introdutores do método, foi êle escolhido para o estudo da proteinorraquia total normal e de seus limites fisiológicos de variação para o LCR cisternal, isto é, aquêle obtido por punção suboccipital. A conceituação da normalidade, em primeiro lugar, para amostras desta procedência se prende ao uso habitual, entre nós, dessa via para colheita de LCR.

MATERIAL E MÉTODOS

A proteinorraquia total foi determinada em amostras de LCR cisternal de 284 pacientes portadores de afecções neurológicas várias. Tôdas eram de LCR incolor; quando o número de células era superior a 3 por mm³, o material foi previamente centrifugado. Quando a determinação de proteinorraquia não pôde ser feita no mesmo dia da colheita, o material foi conservado em congelador.

A técnica utilizada foi a do V. D. R. L. (Bossak, Rosenberg e Harris²), usando-se espectrofotômetro Coleman Junior modelo 6-A (cubas 6-304) e

leitura em comprimento de onda de 420 milimicra. As concentrações correspondentes foram calculadas por carta de calibração obtida pela verificação da transmitância de concentrações conhecidas, estabelecidas pelo método de Kjeldahl (Gráfico 1). Em 271 amostras foi a proteinorraquia total determinada também pelo método de Nissl, conforme modificação de Kafka¹¹; em 149 destas, foi pesquisado o aumento de globulinas (reações de Pandy e Nonne-Appelt). Foram feitas as reações coloidais de Takata-Ara em 143 e do benjoim coloidal em 50 casos dêste último grupo.

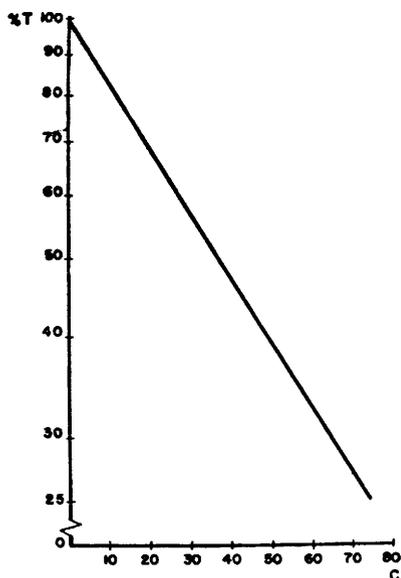


Gráfico 1 — Carta de calibração para a proteinorraquia total pelo método do V. D. R. L.. *Legenda:* %T transmitância; C concentração (mg por 100 ml) determinada pelo método de Kjeldahl.

As concentrações calculadas foram tratadas estatisticamente no sentido de se estabelecer as estimativas, para o que foram utilizadas as fórmulas e normas adotadas por Graner⁸.

RESULTADOS E COMENTÁRIOS

A distribuição das concentrações protéicas correspondentes às 284 amostras que compunham a série está esquematizada na tabela 1 (intervalos de classe de 4 mg por 100 ml). Para essa série, constituída de amostras normais e patológicas, a média foi 21,1 mg por 100 ml e o erro padrão 10,2. Para $t = 5\%$, os limites fiduciais foram 1,1 e 41,1 mg por 100 ml. Como as amostras cujas concentrações eram superiores ao limite máximo tinham caráter patológico, foram excluídas do total, introduzindo-se assim um critério de seleção. As 263 amostras compreendidas até êsse limite foram então grupadas em intervalos de classe de 2 mg (tabela 2) e as estimativas acha-

das foram as seguintes: *média* 19,2 mg por 100 ml; *erro padrão* 6,3; *erro da média* 0,38; limites de significância (para $t=5\%$): 6,9 e 31,5 mg por 100 ml.

Proteinorraquia	Amostras	Proteinorraquia	Amostras
0- 4	0	40-44	5
4- 8	1	44-48	3
8-12	22	48-52	1
12-16	75	52-56	2
16-20	66	56-60	3
20-24	48	60-64	1
24-28	28	64-68	0
28-32	15	68-72	1
32-36	8	72-76	1
36-40	4		

Tabela 1 — Distribuição das amostras em relação à proteinorraquia total (classes de 4 mg por 100 ml).

Proteinorraquia	Amostras	Proteinorraquia	Amostras
1- 3	0	21-23	27
3- 5	0	23-25	17
5- 7	1	25-27	17
7- 9	2	27-29	5
9-11	12	29-31	6
11-13	26	31-33	8
13-15	30	33-35	5
15-17	46	35-37	2
17-19	28	37-39	3
19-21	28	39-41	0

Tabela 2 — Distribuição das amostras em relação à proteinorraquia total (classes de 2 mg por 100 ml).

Estes valores, apontados pela estatística, e que podem ser aproximados para 30 e 20 mg por 100 ml, respectivamente para o limite máximo das variações fisiológicas e para a taxa média normal, encontram correspondência naquêles estabelecidos por métodos onde é mais extensa a experiência. Assim, nas 271 amostras onde se fez também a dosagem pelo método volumétrico

foi possível verificar a concordância entre a interpretação dos resultados obtidos para cada um deles. Das 38 amostras cuja concentração fora igual ou superior a 30 mg por 100 ml pelo método do V. D. R. L., em 33 a concentração, pelo método de Nissl, se comportou de modo semelhante, isto é, foi igual ou superior a 20, limite a partir do qual, neste método, a proteinorraquia cisternal toma caráter patológico.

Comparando as concentrações encontradas pelo método do V. D. R. L. e pelo de Nissl verifica-se, para este, um total 26% inferior. Para as concentrações obtidas para variantes do método do biureto, os valores, pelo método de Kafka, foram menores ainda, nas séries de Gleisz e Hinsberg (40%)⁷ e de Sandmann (45%)¹². Uma vez que as análises citadas e a presente se referem a métodos volumétricos muito semelhantes, as concentrações encontradas pelo método do biureto foram, portanto, superiores às demonstradas pelo do ácido tricloracético. Este fato comprova a demonstração anteriormente feita¹³ quanto ao aumento da média determinado pela influência do erro efetivo do aparelho sobre as concentrações obtidas.

Amostras	Pesquisa de globulinas	Reações coloidais		Proteinorraquia	
		Takata-Ara	Benjoim	VDRL	NISSL
1	±	—	00000.12210.00000.0	29,0	20
2	±	—	00000.12210.00000.0	27,8	20
3	±	—	00000.22100.00000.0	23,6	20
4	++	+f		74,3	50
5	±	—	00000.01210.00000.0	23,5	20
6	±	—	00000.12210.00000.0	17,4	20
7	±	—	00000.12211.00000.0	42,5	30
8	±	—	00000.22210.00000.0	31,7	30
9	+	+f	12100.22210.00000.0	32,7	20
10	±	—		14,0	20
11	±	—	00000.12221.00000.0	30,8	20
12	±	—		19,5	20
13	+	—	12100.22100.00000.0	22,0	20
14	+	—	00000.22222.00000.0	57,8	35
15	+	—	11001.22210.00000.0	42,5	30
16	+	—	00000.12221.00000.0	25,9	20
17	+	—		35,7	30
18	±	—		17,7	20
19	±	—		30,8	20
20	±	—	00000.12210.00000.0	31,3	20
21	++	+f	22222.22221.00000.0	51,8	35
22	±	—	00000.22210.00000.0	45,8	25
23	+	+f	12221.22210.00000.0	34,7	30
24	+	+v	00000.12222.21000.0	32,7	40
25	±	—		26,3	20

Tabela 3 — Amostras com positividade das reações de pesquisa de globulina. Legenda: (—) negativa; (±) opalescente; (+) positiva; (++) fortemente positiva; (f) reação do tipo flocculante; (v) reação do tipo vermelho. Para a reação do benjoim coloidal: (o) ausência de flocculação; (1) flocculação parcial; (2) flocculação total. Proteinorraquia em mg por 100 ml.

Bossak e col. trabalhando com diversas concentrações relativas entre globulinas e albumina verificaram a variação inapreciável introduzida no resultado da proteinorraquia total pelo método do V. D. R. L. Esta observação é comprovada nos 25 casos reunidos na tabela 3, onde as concentrações encontradas por este método e pelo de Nissl não se afastaram da proporção média anteriormente referida para êles. A homogeneidade entre os valores respectivos da proteinorraquia total ocorreu independentemente dos diversos tipos de alterações globulinicas apontadas pelas reações coloidais. Êsses casos correspondem aos que apresentavam positividade das reações de pesquisa de globulinas. Em que pesem as opiniões desfavoráveis quanto à especificidade das reações de pesquisa de globulinas, especialmente da reação de Pandey^{3, 14}, as alterações das reações coloidais, especialmente as de tipo parenquimatoso têm sido postas na dependência direta de alterações de globulinas. Tal fator, embora não sendo o único, tem sido comprovado⁵ pela análise eletroforética e por determinações bioquímicas, as quais têm mostrado entre outros achados, haver aumento de gama-globulina no LCR em condições que produzem alterações coloidais do tipo parenquimatoso.

CONCLUSÕES

O método de determinação da proteinorraquia total pela medida espectrofotométrica da turvação produzida pelo ácido tricloracético — método do V. D. R. L. — satisfaz as exigências para o emprêgo prático, pela simplicidade de sua execução e pela qualidade dos resultados que fornece. Êstes são precisos do ponto de vista instrumental porque as taxas habituais não estão sujeitas ao seu erro efetivo; êste fato, anteriormente demonstrado³¹, é confirmado nas 284 amostras de LCR analisadas pois a concentração protéica, em tôdas, correspondeu à transmitância menor que 90%.

A influência pequena das taxas relativas de albumina e globulinas a que o método está sujeito² é comprovada em 25 casos nos quais a alterações de globulinas de vários tipos não corresponderam taxas de proteinorraquia total discordantes das que foram encontradas pelo método volumétrico.

O tratamento estatístico das concentrações protéicas encontradas para 284 amostras de LCR cisternal permitiu estabelecer como taxa média normal a concentração de 20 mg por 100 ml e como limite máximo das variações fisiológicas a taxa de 30 mg por 100 ml. A taxa normal para amostras lombares e ventriculares será objeto de estudo ulterior.

RESUMO

A taxa de proteínas totais foi determinada em 284 amostras de L. C. R. cisternal pelo método turbidimétrico do ácido tricloroacético de Bossak, Rosenberg e Harris (método do V. D. R. L.). O tratamento estatístico dos valores obtidos permitiu estabelecer, como taxa média normal, a concentração de 20 mg por 100 ml e, como limite superior das variações fisiológicas, a de 30 mg por 100 ml.

As concentrações obtidas pelo método de Nissl, nessa série, foram 26% mais baixas que as encontradas pelo método do V. D. R. L.. Variações qualitativas das globulinas, demonstradas por alterações específicas das reações coloidais não influíram sobre os resultados conforme demonstraram as concentrações obtidas pelos dois métodos. Estes dados permitiram aos autores do presente trabalho comprovar seus achados anteriores sobre a precisão do método do ponto de vista do erro instrumental efetivo a que está sujeito e as conclusões dos autores do método sobre a influência inapreciável das taxas relativas de albumina e globulinas.

SUMMARY

Normal protein content of cisternal cerebrospinal fluid

Total protein concentration in 284 samples of cisternal cerebrospinal fluid was evaluated by V. D. R. L.'s method of Bossak, Rosenberg and Harris. Statistical treatment of results permitted to establish as average normal concentration, 20 mg/100 ml and the upper limit for physiological shifts, 30 mg/100 ml.

Values 26% lower were obtained for most of these samples by the volumetric technic of Nissl, as modified by Kafka. Globulin changes appointed by colloidal reactions did not affect results as showed concentrations obtained by both methods. These data confirm former findings of the authors on safety of V. D. R. L.'s method concerning the instrument effective error and that of Bossak and co-workers on the ineffective influence of albumin-globulin ratio on total protein concentration obtained.

BIBLIOGRAFIA

1. BAUER, H.; ANGELSTEIN, I. — Zur Methodik der Gesamteiweissbestimmung im Liquor. *Klin. Wschr.* 30(11-12):277-279; (15, março) 1952.
2. BOSSAK, H. N.; ROSENBERG, A. A.; HARRIS, A. — A quantitative turbidimetric method for the determination of spinal fluid protein. *J. Ven. Diseases Inform.* 30(4):100-103; (abril) 1949.
3. BULLOCK, F. N.; FLEICHBAKER, H. H. — Interpretation of Pandy test. *Acta Psychiat. et Neurol. Scand.* 26(2):149-153; 1951.
4. CIPRIANI, A.; BROPHY, D. — A method for the determining cerebrospinal fluid protein by the photoelectric colorimeter. *J. Lab. a. Clin. Med.* 28(10):1269-1272; (julho) 1943.
5. FRANTZEN, E. — A survey of methods for the determination of the protein fractions in the cerebrospinal fluid. *Acta Psychiat. et Neurol. Scand.* 30(1-2):217-225; (março) 1955.
6. GALL, D.; HUTCHINSON, M. P.; YATES, W. — The estimation of cerebrospinal fluid protein in sleeping sickness: Sicard and Cantaloube's method and a sulphosalicylic method. *Ann. Tropical Med. a. Parasitol.* 49(4):419-428; (dez.) 1955.
7. GLEISZ, J.; HINSBERG, K. — Vergleichende Liquoreiweissbestimmungen und ihre Bedeutung für die Liquoreiweissdiagnostik. *Arch. Kinderheilk.* 139(2):65-70; 1950. *In Exc. Med.* VIII 5(3)§791, pag. 201; (março) 1952.
8. GRANER, E. A. — Como Aprender Estatística. Ed. Melhoramentos, São Paulo, 1952.
9. HARDING, V. L.; HARRIS, A. — The effect of temperature variants on quantitative turbidimetric determinations of spinal fluid protein, using trichloroacetic acid. *J. Ven. Diseases Inform.* 30(11):325-327; (nov.) 1949.
10. KAFKA, V. — Bemerkungen zur Technik

der Eiweissreaktion der Cerebrospinal flüssigkeit. Klin. Wschr. 33(15-16):405-406; (15, abril) 1955. 11. LANGE, O. — Proteínas do líquido céfalo-raquidiano. Métodos para sua determinação. Seu valor para o diagnóstico e prognóstico de algumas afecções do sistema nervoso central. Rev. da Assoc. Paulista de Med. 4(4):153-169; (abril) 1934. 12. SANDMANN, F. — Vergleichende Liquoreiweissbestimmungen mit der Methode von Gleisz und Hinsberg. Münch. med. Wsch. 94(12):567-569; (21, março) 1952. 13. SPINA-FRANÇA, A.; CERQUEIRA, F. M. C.; AMAR, I. — Proteinorraquia; estudo crítico de métodos de dosagem. Arq. Neuro-Psiquiat. 13(4):303-312; (dez.) 1955. 14. WIKOFF, H. L.; KAZDAN, P. — A critique of methods for determination of protein in CSF. Amer. J. Clin. Pathol. 21(12):1173-1177; (dez.) 1951.

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