

Cl. 30
8



ELECTROFORESE E IMUNOQUÍMICA

II — ASPECTOS CLÍNICOS DA ELECTROFORESE DAS PROTEÍNAS DO SORO EM PAPEL DE FILTRO

ANTÓNIO PEDRO FRANCO

Assistente do I. M. T.

Bolseiro do Instituto de Alta Cultura: no Centro de Estudos
das Doenças Infecciosas

Separata dos ANAIS DO INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL — INFORMAÇÃO
BIBLIOGRÁFICA, Volume XIV, Suplemento N.º 1 — Março de 1957

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
E DE MEDICINA TROPICAL
DE LISBOA
BIBLIOTECA

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL
CADEIRA DE BACTERIOLOGIA E VIRULOGIA
(Prof. MANUEL R. PINTO)

ELECTROFORESE E IMUNOQUÍMICA

II – ASPECTOS CLÍNICOS DA ELECTROFORESE DAS PROTEÍNAS DO SORO EM PAPEL DE FILTRO

ANTÓNIO PEDRO FRANCO

Assistente do I. M. T.
Bolseiro do Instituto de Alta Cultura; no Centro de Estudos
das Doenças Infecciosas

SUMÁRIO

I – A REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

- 1 – A tira de papel
- 2 – A curva de electroforese
- 3 – Os valores numéricos

II – A CURVA NORMAL DE ELECTROFORESE DAS PROTEÍNAS DO SORO

- 1 – Os acidentes da curva
- 2 – Características físico-químicas e significado das fracções proteicas do soro:
 - a – Albumina
 - b – Globulina α
 - c – Globulina β
 - d – Globulina γ
- 3 – Os valores médios normais

III — AS ALTERAÇÕES A CURVA NORMAL

- 1 — Alteração por aumento predominante de uma fracção
 - a — Aumento predominante da fracção γ
 - b — Aumento predominante da fracção α
- 2 — Alteração por diminuição predominante de uma fracção

IV — CONSIDERAÇÕES FINAIS

V — BIBLIOGRAFIA

Tratámos em trabalho anterior (1) dos fundamentos e métodos técnicos da electroforese; procuramos agora analisar alguns aspectos práticos da aplicação à clínica, da electroforese das proteínas do soro em papel de filtro. Com esse fim trataremos em primeiro lugar do modo de apresentação dos resultados da electroforese, analisando sumariamente vantagens e limitação de cada um, para, seguidamente, passarmos ao estudo da curva normal de electroforese e suas variações fisiológicas. Depois analisar-se-ão os principais tipos da alteração à curva normal, tratando a seguir da interpretação clínica dos resultados. Por último, far-se-ão breves considerações sobre as aplicações práticas da electroforese à clínica com as quais se encerra este trabalho.

Em todo ele tivemos em vista um objectivo fundamental, já definido no primeiro trabalho desta série: tornar menos árdua a tarefa dos clínicos que, afastados dos grandes centros, mantêm vivo o seu interesse por conhecer as possibilidades e utilização das técnicas mais recentes de diagnóstico e investigação. Para atingir tal fim, seremos voluntariamente esquemáticos e sucintos, procurando, apesar disso, não deixar de aludir a alguns aspectos de pormenor que nos parecem de maior importância.

Excluimos deste trabalho o estudo das alterações do fibrinogénio, para o qual a electroforese em papel de filtro poderá considerar-se de menor valor e que, por outro lado nos levariam a entrar na análise das alterações da coagulação, afastando-nos do nosso objectivo de momento. Limitamos, portanto, o seu âmbito ao estudo dos resultados da electroforese das proteínas do soro, e não do plasma.

I — A REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Interrompida a corrente e secas as tiras de papel onde foi feita a separação electroforética das proteínas do soro, acabado o processo de coloração escolhido, seja o azul de bromofenol, seja o negro de amido ou outro, põe-se o problema de como representar o resultado em termos de permitir a sua análise e interpretação. Tal problema adquire importância fundamental quando pretende aplicar-se a electroforese à clínica.

Analizamos a seguir o valor relativo de cada um dos elementos de que poderá dispor-se para esse fim: a própria tira de papel, a curva de electroforese, os valores numéricos resultantes do estudo quantitativo das fracções isoladas.

A tira de papel

A tira de papel seca e corada após a electroforese constitui por si uma primeira possibilidade de avaliação dos resultados.

Com efeito, é possível, pelo exame da tira, suspeitar, quer de uma situação de plasmocitoma, quer, pelo contrário, de uma agamaglobulinémia. Para indivíduos bem treinados é mesmo possível, por essa simples observação pensar numa situação de nefrose ou de cirrose hepática, por exemplo (Fig. 1).

Deve, porém, fazer-se notar que este exame da tira de papel é muitas vezes, enganador, e a maior ou menor intensidade relativa das manchas referentes às diversas fracções não chega para basear uma interpretação. Não deve esquecer-se que, para além da intensidade de coloração da mancha, interessa ao estudo quantitativo das fracções a sua extensão relativa, visto, como é natural, uma mesma quantidade de proteína dar uma mancha de intensidade diferente, conforme ocupe uma extensão maior ou menor da tira de papel.

Por outras palavras, a intensidade de cor sendo inversamente proporcional ao espaço ocupado pela mesma quantidade de substância, e sendo, por outro lado, muito mais sugestivas as diferenças de intensidade das manchas coradas do que as diferenças entre as áreas respectivas, é enganadora, sobretudo para quem não esteja familiarizado com os problemas técnicos da electroforese, qualquer conclu-

são que pretenda tirar-se de um primeiro exame da tira de papel. Para além das situações com aumento ou diminuição extremos de uma das fracções (plasmocitoma, por exemplo), o exame das tiras de electroforese poucos elementos seguros dá para a interpretação da situação clínica.

Por tudo isto, parece-nos destituído de qualquer interesse clínico, a utilização da tira de papel como expressão do resultado de uma electroforese das proteínas do soro.

A curva de electroforese

Tendo tratado em trabalho anterior (1) do modo de obtenção da curva de electroforese, limitar-nos-emos aqui a analisar a curva de electroforese como base de interpretação dos resultados.

Quer obtida por eluição, quer por densitometria directa, a curva de electroforese apresenta, em primeira mão, as dificuldades de interpretação da própria tira: o impressionar mais, à primeira vista, a intensidade dos acidentes do que a sua extensão. Por outras palavras: são as diferenças na altura dos acidentes que se tornam mais sugestivas na análise das curvas. É preciso, porém, ter presente que para a interpretação dos resultados conta, fundamentalmente, a área dos acidentes e não só a sua altura.

Quer dizer: são os resultados quantitativos, numéricos, que interessam, principalmente, na interpretação dos resultados da electroforese.

Todavia, não nos parece suficiente, para uma boa interpretação dos resultados, o simples conjunto dos números representativos das quantidades de cada fracção proteica.

Com efeito, para além do aspecto puramente quantitativo dos resultados, há ainda a considerar os aspectos qualitativos — relacionados com a homogeneidade e heterogeneidade das fracções, por exemplo, que podem ser da maior importância na distinção entre um plasmocitoma «gama» — e outras situações com hepiergamaglobulinemia, como a cirrose hepática. Voltaremos a abordar este assunto com maior desenvolvimento ao tratarmos dos acidentes da curva normal.

Por tudo isto, consideramos de interesse a utilização da curva para a análise qualitativa dos resultados da electroforese com a

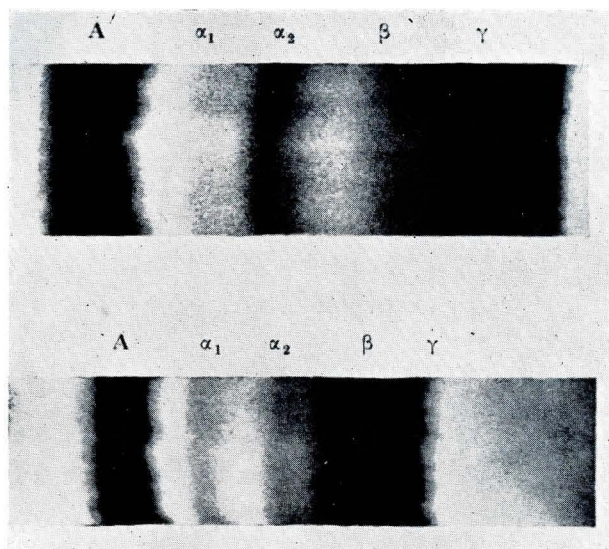


Fig. 1 — Tiras correspondendo a cirrose hepática e plasmocitoma de β .

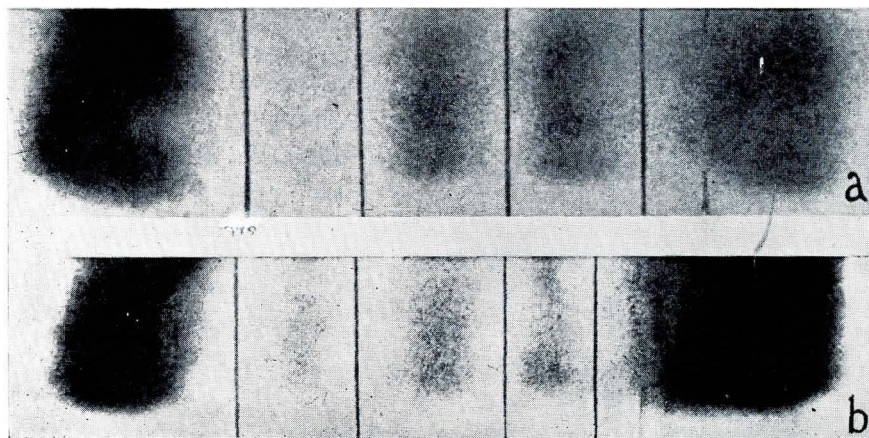


Fig. 2 — Modo de fraccionamento das tiras para eluição.

reserva de não dever ser utilizada, em si mesma, na apreciação do aumento ou diminuição das fracções, os quais só devem ser valorizados pela sua expressão numérica.

Os valores numéricos

O estudo quantitativo das fracções proteicas pode fazer-se sem necessidade de traçar a curva.

O processo mais corrente nestas condições é a eluição das fracções, uma por uma, e leitura subsequente dos eluídos em fotocolorímetro. Para isto, marca-se na tira a linha de separação entre as fracções e cortam-se os pedaços correspondentes a cada uma (Fig. 2). Faz-se a eluição como foi dito no primeiro trabalho desta série, lendo no fotocolorímetro a absorção correspondente à totalidade de cada fracção. Os valores de absorção são somados e estabelecida a percentagem de cada fracção em relação ao total.

Na maior parte das vezes, porém, os dados quantitativos são obtidos a partir da curva, por cálculo das áreas das fracções.

Quando se estabelecem os limites entre as fracções por linhas verticais como dissemos a propósito da análise dos traçados (1) podem calcular-se os valores relativos das fracções, recortando os segmentos da curva correspondentes a cada fracção e pesando os pedaços respectivos. A relação, em percentagem, estabelecida entre estes, é idêntica à existente entre as áreas dos respectivos acidentes, partindo do princípio de que o papel tem contextura regular, que garanta a mesma espessura em todos os pontos.

Pode, porém, utilizar-se o processo da extrapolação para complemento dos acidentes, caso em que é necessário fazer o cálculo directo da área, para o qual pode utilizar-se um planímetro.

Para boa reprodutibilidade dos resultados é necessário, ou que as curvas sejam ampliadas em tamanho grande ou um particular cuidado de quem faz a determinação, visto que, para acidentes pequenos, com área diminuta em valor absoluto, os valores obtidos em cada determinação são altamente susceptíveis de erros, os quais, embora pequenos, vêm depois a reflectir-se, com maior importância, no cálculo das percentagens.

Se se usa o papel milimétrico para o traçado das curvas, pode

calcular-se a área pela contagem dos quadrados inscritos em cada acidente.

Nós utilizamos ultimamente um processo que nos dá valores perfeitamente concordantes com os obtidos por outras formas. Nele partimos do princípio de que as curvas são idênticas na sua forma e definidas pela equação correspondente à curva de Gauss:

$$S = K. ba \quad (1)$$

onde K é uma constante relacionada com a forma da curva.

Como, mais do que o cálculo absoluto das áreas reais dos acidentes interessa estabelecer as relações entre elas, e como, a presença de um factor constante na equação que as determina não interessa ao estabelecimento dos valores relativos, basta calcular os produtos da base pela altura de cada acidente — sempre definido por extrapolação — somá-los e estabelecer a proporção em relação a 100.

Como dizemos acima, este processo tem-nos dado resultados perfeitamente concordantes com os das outras técnicas e tem a vantagem de ser nitidamente menos trabalhoso e delicado na execução.

Temos tratado até aqui da obtenção de valores medindo a grandeza relativa de cada fracção em relação ao total. Acontece, porém que, para além destes valores relativos há interesse em conhecer o valor absoluto de cada fracção.

Suponhamos o exemplo mais flagrante de hemoconcentração em que pode haver hiperproteinemia com conservação dos valores relativos das diversas fracções. Neste caso, só a determinação da proteinémia total nos dará, como no caso contrário, de hipoproteinémia, a medida da alteração proteica.

Acontece até que em certas situações deste último tipo pode haver aumento relativo das fracções globulínicas, por baixa de albumina, sem que haja aumento real dessas fracções que, por vezes, podem mesmo, nessas circunstâncias, estar diminuídas. Portanto, só deve considerar-se completa a representação dos resultados de electroforese das proteínas do soro, quando acompanhadas da determinação química da proteinémia total, de preferência com estabelecimento dos valores absolutos de cada fracção, calculados por meio das percentagens.

Em resumo, e segundo a nossa opinião, o resultado completo de uma electroforese das proteínas do soro em papel de filtro, deve compreender:

- 1 — O traçado da curva.
- 2 — O cálculo dos valores relativos, em percentagem de total.
- 3 — A determinação química da proteinémia total em gr por 10 ml.
- 4 — A determinação dos valores absolutos das fracções em gr por 100 ml.

II — A CURVA NORMAL DE ELECTROFORESE DAS PROTEÍNAS DO SORO

Passamos agora a estudar a curva média normal da electroforese das proteínas do soro. Em virtude das considerações feitas no capítulo anterior, e para comodidade de exposição, ao referirmo-nos, daqui em diante, a curva das proteínas, englobamos na designação não só a curva em si mesma, como os resultados da sua análise quantitativa, considerando sempre a determinação complementar da proteinémia total.

Os acidentes da curva

A curva normal das proteínas do soro apresenta 4 acidentes fundamentais (Fig. 3). Um, normalmente o mais acentuado e agudo, sobrelevando em muito a altura dos restantes, corresponde à albumina; os 3 restantes, bastante menos elevados, como formando um bloco entre si, correspondem às globulinas, α , β e γ . Em certas condições técnicas observa-se entre a albumina e o maciço das globulinas um acidente pouco acentuado correspondendo à globulina α_1 , caso em que o acidente imediatamente antes da globulina β deverá considerar-se correspondendo à globulina α_2 (Fig. 4). Também em certas condições se conseguem desdobrar os acidentes correspondentes à globulina β e γ em outros correspondentes a sub-fracções de β e γ , acerca dos quais voltaremos a falar mais adiante. Os acidentes correspondentes às diferentes fracções proteicas apresentam-se como

curvas que Gauss imbricadas entre si, de modo a formarem, no todo, uma linha com reentrâncias e saliências alternadas. Estas últimas correspondem aos vértices das curvas de Gauss referentes a cada fracção proteica e definem a localização da zona de maior concentração da fracção respectiva na tira de papel de filtro.

Considerando cada uma das fracções proteicas do soro constituída por uma «população» de moléculas idênticas entre si, no que se refere a mobilidade electroforética, fàcilmente se entende que a totalidade das moléculas constituintes dessa «população» se encontraria agrupada no mesmo ponto da tira de papel, no momento de interrupção da corrente eléctrica. Acontece, porém, não ser materialmente possível que tal suceda, visto essas moléculas necessitarem de uma certa extensão do papel para se agruparem na sua totalidade. Sendo assim, se outros factores não interferissem na distribuição das moléculas, elas amontoar-se-iam em maior quantidade na zona da tira que corresponde à sua mobilidade média, dispondo-se em igual quantidade para aquém e para além dessa zona, de acordo com a curva de distribuição regular de uma população homogénea em torno de um ponto médio. Este tipo de distribuição corresponde, como se sabe, à curva simétrica de Gauss.

Tem-se discutido se as curvas correspondentes aos acidentes obtidos na electroforese em papel obedecem às características da curva de Gauss. Alguns afirmam que devido à acção da electromose o bordo da mancha voltado para o eléctrodo positivo é muito mais bem definido do que o correspondente ao lado do eléctrodo negativo, onde foi colocada a gota de soro (4). Por este motivo a vertente da curva oposta ao sentido de deslocação seria mais alongada do que a outra.

Mesmo quando os acidentes se apresentem como curvas simétricas parece não deverem assimilar-se a curvas de Gauss, pelo menos do ponto de vista teórico, dado que, numa mistura complexa como o soro, cada acidente corresponde a fracções que não são perfeitamente homogéneas por serem constituídas por vários componentes que se assemelham pelo tamanho, forma e mobilidade electroforética das suas moléculas.

Seja como for, porém, não temos dúvida em considerar, para efeitos de interpretação prática, os acidentes da curva de electroforese

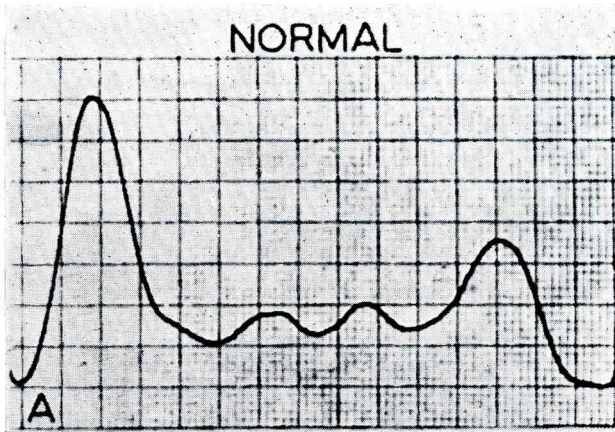


Fig. 3 — Tipo de curva normal.

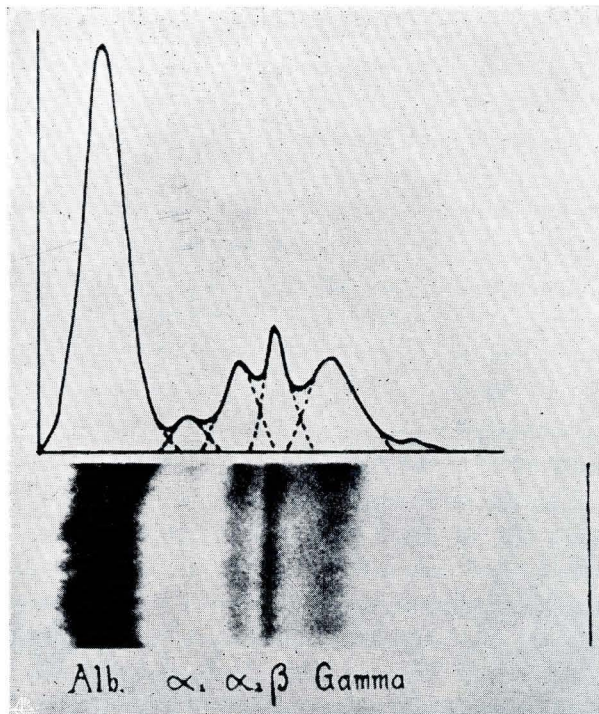


Fig. 4 — Tipo de curva com individualização da fracção α_1 .

como fragmentos de curvas do tipo gaussiano, que se podem completar por extrapolação para efeitos de análise quantitativa.

Convém, no entanto, não deixar de fazer ressaltar a diferença fundamental entre os acidentes verificados nas curvas obtidas por electroforese em meio líquido livre e os derivados da análise das curvas de electroforese em papel de filtro. Com efeito, naquelas, os acidentes traduzem os gradientes de concentração ao longo das zonas de fronteira, enquanto, nestas, tais acidentes exprimem variações de quantidade total da substância fixada ao longo da tira de papel. Por outras palavras, embora as curvas obtidas nos dois casos apresentem acidentes semelhantes, elas não traduzem os mesmos fenómenos nem podem ter o mesmo significado (5). O facto de poderem ser igualmente utilizadas para efeitos de análise das misturas proteicas como o soro, não deve, porém, fazer esquecer essa diferença de significado e origem.

Admitido, para efeitos práticos de análise o carácter gaussiano dos acidentes da curva de electroforese das proteínas do soro em papel de filtro, convém estudar esses acidentes quanto a certos aspectos da sua forma. Referimo-nos à relação entre a base e altura dos acidentes relacionados com as diversas fracções.

É evidente que, se numa dada fracção proteica, as moléculas fossem perfeitamente idênticas entre si, elas se agrupariam à volta de um ponto ou zona definidos pela sua mobilidade média, tão justas entre si quanto lho permitissem a sua forma e tamanho, ocupando no papel a mínima extensão materialmente possível. Por outras palavras, a curva representativa da variação da quantidade de substância ao longo da tira variaria rapidamente, desde a ordenada zero até ao máximo, descendo da mesma forma. A curva apresentaria assim uma forma muito alongada verticalmente, com uma altura muitas vezes superior à maior largura. Mas se, em lugar de ser constituída por moléculas inteiramente idênticas, tal fracção fosse constituída por moléculas que, embora semelhantes, possuíssem mobilidades ligeiramente diferentes, essas moléculas espalhar-se-iam ao longo da tira de papel e em torno do ponto definido pela sua mobilidade média, de modo a ocupar uma extensão muito maior, escalonadas segundo as suas diferenças de mobilidade. Este facto traduzir-se-ia pela formação de um acidente muito mais alargado do que o anterior, com

uma base muito maior em relação à altura, a traduzir a relativa heterogeneidade das moléculas constituintes da fracção respectiva.

A análise dos acidentes de uma curva de electroforese partindo deste ponto de vista permite formar opinião acerca da homogeneidade ou heterogeneidade das fracções respectivas. A este respeito, a fracção albumina apresenta-se, em geral, como a fracção mais homogênea do soro, enquanto as fracções globulínicas se apresentam com características de maior heterogeneidade.

Esta apreciação do grau de homogeneidade das fracções tem interesse clínico, como veremos mais adiante.

Características físico-químicas e significado das fracções proteicas do soro

Temos tratado até aqui dos diversos aspectos da curva de electroforese das proteínas do soro, considerados em si mesmos. Chegou a altura de estudarmos as fracções proteicas que os condicionam analisando, embora sumariamente, as suas características electroforéticas, constituição química e significado fisiopatológico.

Não só o diferente comportamento num campo eléctrico como outras características físico-químicas levaram a considerar no soro, fundamentalmente 4 fracções proteicas: as albuminas e as globulinas α , β e γ .

Nestas fracções agrupam-se diferentes tipos de proteínas que no entanto se assemelham por algumas das suas características como solubilidade, cargas eléctricas, forma e tamanho da molécula, etc.

Modernos processos de análise, incluindo o aproveitamento das propriedades imunobiológicas das proteínas, como a imunolectroforese em agar, permitem revelar a presença, no soro, de um muito maior número de fracções proteicas, demonstrando, particularmente, a heterogeneidade de algumas fracções globulínicas (7).

O peso molecular das proteínas do soro varia entre largos limites, sendo o peso molecular da albumina da ordem dos 69.000 e variando os das globulinas predominantes à roda dos 150.000 e 160.000 (8) com valores extremos da ordem dos 1.300.000 para as β -lipoproteínas (9).

A forma das moléculas é diferente de umas para outras, asse-

melhando-se, na sua maior parte, a bastonetes mais ou menos alongados e chegando algumas a aproximar-se da forma esférica (Fig. 5).

Os pesos moleculares e a forma das moléculas condicionam o comportamento de misturas como o soro, durante a ultracentrifugação, identificando-se em geral tantos componentes quantos os tipos de moléculas presentes.

Por exemplo, o soro de cavalo apresenta, nestas condições, dois componentes fundamentais, a que correspondem as constantes de sedimentação

$$\begin{aligned} S_{20}^0 &= 4,5 \times 10^{-13} \\ S_{20}^0 &= 7,1 \times 10^{-13} \end{aligned} \text{ cm/seg/unidade de campo}$$

A constante de sedimentação mais baixa corresponde às albuminas, com um peso molecular médio de cerca de 70.000 e a mais elevada às globulinas, com peso molecular à volta dos 167.000.

Pela ultracentrifugação é possível determinar a presença de pequenas quantidades de outros componentes como, ainda no caso do soro de cavalo, uma globulina de elevado peso molecular (cerca de 900.000) a que corresponde uma constante de sedimentação de $S_{20}^0 = 18 \times 10^{-13}$ (8).

Damos a seguir os valores das constantes de sedimentação determinadas para os diferentes componentes revelados por ultracentrifugação nas quatro fracções principais do soro humano (9), expressos em Svedberg (unidade absoluta $\times 10^{-13}$ (13)).

Fracção proteica	Valor da constante de sedimentação
Albumina	4,6
Globulina «alfa»	5 9
Globulina «beta»	5,5 7 20 ×
Globulina «gama»	7,2 a 10

O comportamento electroforético das proteínas num campo eléctrico varia, como foi dito antes (1) com a composição, pH e força iónica do tampão em que se faz a electroforese. Indicam-se, a seguir, como exemplo, os valores da mobilidade electroforética das diversas fracções determinadas em tampões de pH diferente e expressas em $\text{cm}^2/\text{seg}/\text{volt} \times 10^{-5}$:

pH do tampão	Mobilidade das fracções				
	Albumina	«Alfa»	«Alfa» 2	«Beta»	«Gama»
6,02 (10)	- 4,60	- 3,34		- 2,55	+ 0,01
8,60 (11)	5,7 a 6,2	4,6 a 5,1	3,4 a 4,1	2,5 a 3,2	0,8 a 1,3
8,80 (12)	6,48	5,15	3,02	3,02	1,27

Albumina — É uma fracção do soro constituída por moléculas relativamente simétricas com uma relação entre os eixos de cerca de 1/4 (eixo longitudinal = 150 Å; eixo transversal = 38 Å (9)).

O seu ponto iso-eléctrico corresponde a um pH de cerca de 4,9 (14) e a mobilidade electroforética, em tampão de veronal, de pH 8,6 e concentração iónica 0,1 varia entre 5,7 e 6,2 $\times 10^{-5}$ $\text{cm}^2/\text{seg}/\text{volt}$.

Pode considerar-se uma das fracções mais homogéneas do soro, como o provam as investigações feitas com os métodos de imuno-electroforese em agar e o poder obter-se, com relativa facilidade, no estado puro, cristalizada. Parece não conter hidratos de carbono (15) nem lípidos (16) e na sua constituição proteica, verificou-se ser mais pobre em serina e glicina e mais rica em cistina e lisina do que as outras fracções.

Estudos exaustivos de várias escolas tem atribuído ao fígado o papel de produtor da albumina do soro, o que parece ter sido confirmado em experiências recentes, combinando a electroforese com a marcação de amino-ácidos por radioisótopos (lisina marcada com C^{14}) (18-19-20).

Alguns admitem a possibilidade de formação de albumina no sistema retículo endotelial (21), mas a produção de albumina pelo fígado continua a ser aceite pela grande maioria dos autores.

Do ponto de vista fisiopatológico, a albumina tem papel prepon-

derante na distribuição da água no organismo e na fisiopatologia dos edemas, pela sua influência no estabelecimento do equilíbrio de Donnan entre os fluidos intravascular e intersticial.

A importância da albumina nesse fenómeno evidencia-se pelo conhecimento de que a pressão osmótica ou coloidosmótica de uma solução de albumina a 1 % é da ordem dos 7,9 cm de água, enquanto a de igual concentração de globulinas está compreendida entre 1 e 3 cm (22). Atribui-se ainda à albumina função de transporte, no que se refere a algumas vitaminas hidrossolúveis como a C, bilirrubina e corantes (bromosulfoftaleína, vermelho de fenol, carmim de indigo, etc.).

Globulina α — A fracção globulínica α constitui, como a fracção β uma das fracções mais heterogéneas do soro. Nelas se incluem moléculas complexas, lipo e glucoproteínas, com funções importantes de transporte, além da proteína C-reativa, algumas esterases, a hepatoglobina (23) e a tiroxina (24).

A forma média das moléculas é mais alongada do que a da albumina, com uma relação entre eixos da ordem dos 1/6 e com peso molecular compreendido entre 200.000 e 300.000. O ponto isoeléctrico corresponde a pH 5,2 e 4,9 para as duas sub-rações α_1 e α_2 e a mobilidade electroforética varia entre 5,1 e 3,6 cm²/seg/volt nas condições indicadas para a albumina.

As lipoproteínas α correspondem a cerca de 25 % dos lípidos do soro, com um peso molecular da ordem dos 200.000 (3). Quanto às glicoproteínas averiguou-se para o componente principal, uma mobilidade idêntica à da fracção α , a que corresponde uma constante de sedimentação de $S_{20}^0 = 2,8$ Svedberg em tampão de pH 8,4 (25) com um peso molecular de 30.000 a 44.000 (26).

Convém aqui definir a terminologia empregada por alguns autores acerca dos complexos formados entre radicais proteicos e hidratos de carbono. É característico destes complexos a presença de hexosamina na molécula e consideram-se como mucoproteínas as que tenham mais de 4 % de hexosamina e como glucoproteínas as de teor de hexosamina inferior a 4 %, limite que define características de solubilidade diferentes em relação ao álcool (27).

Esta distinção nem sempre é tida em conta por grande parte dos

autores, e, para fins práticos de aplicação à clínica, os dois termos confundem-se habitualmente.

O valor clínico do estudo destas glicoproteínas estaria ligado ao seu aumento relativo nos processos inflamatórios agudos e nas neoplasias.

Globulinas — Constituindo uma fracção igualmente heterogénea, como a globulina α contém a maior parte das lipoproteínas do soro (cerca de 75 %), às quais estão ligados a quase totalidade dos carotínóides e parte dos estrogéneos. Com elas está intimamente relacionado à fracção X, identificada por ultracentrifugação, com um peso molecular mínimo de 500.000 (29-30). O peso molecular das lipoproteínas β chegaria a atingir 1.300.000 (9).

Discute-se o tipo de união entre lípidos e proteínas, mas pensa-se que se trata de proteínas conjugadas, com um grupo prostético lipídico. Não se provou, até agora, que apresentassem composição química e propriedades físicas constantes, nem especificidade imunobiológica, assim como propriedades características do conjunto e diferentes dos grupos químicos componentes (3). Alguns supõem que os lípidos estão interpostos entre lâminas de globulina ou cobertos por uma delgada película, com a espessura das cadeias laterais de polipeptidos (31).

Estas lipoproteínas teriam função solubilizante e transportadora dos lípidos, condicionando a passagem destes através de certas membranas (32) e regulando, assim, o seu acesso ao sistema retículo endotelial, ao fígado e aos depósitos. Interferem na reacção antigénio-anticorpo (33-34) e diminuiriam a acção hemolítica dos ácidos gordos (35), ao mesmo tempo que influiriam na afinidade do soro para a água e lípidos (36-37-38).

Desconhece-se exactamente o local e mecanismo da sua produção, que parece relacionada com a acção da heparina (3).

A mobilidade electroforética da fracção β varia de 2,5 a 10^{-5} cm²/seg/volt, nas condições já indicadas, com ponto iso-eléctrico entre pH 5,4 e 6,3.

A forma da molécula varia desde a esferoidal da sub-fracção β , (lipoproteína) com cerca de 185 Å de diâmetro até à forma alongada com uma relação aproximada de 1/5 entre eixos (9). O peso

molecular mínimo é da ordem dos 90.000 com constantes de sedimentação entre 5,5 e 20 Svedberg.

Esta fracção contém, além dos complexos lipoproteicos, complexos glicoproteicos com significado semelhante aos da fracção α , assim como complexos de transporte metaloproteicos.

Encontram-se nela, ainda, a profibinolisinina, a protrombina, o factor C_1' do complemento, e alguns anticorpos, como as crioglobulinas e outras.

Fracção γ : — A fracção γ das globulinas constitui uma das fracções proteicas mais interessantes do soro, pela natureza e significado biológico dos seus componentes. Nela se encontram a maioria dos anticorpos provocados pela acção dos agentes infecciosos, e o estudo da sua variação tem grande interesse para o conhecimento da capacidade reaccional dos indivíduos. É a fracção com o maior interesse terapêutico e aquela que mais contribuiu, por isso, para o aperfeiçoamento das técnicas de fraccionamento do soro com fins preparativos. Por outro lado é a fracção globulínica que mais acentuadamente se altera nas diversas situações patológicas. Pode dizer-se que a grande maioria das situações de hiperproteinémias se acompanham de aumento da globulina γ , do mesmo modo que as hipoproteinémias se acompanham de hipoalbuminémia. Possui a característica particular de apresentar uma heterogeneidade electroforética que não está de acordo com a homogeneidade verificada por métodos habitualmente mais sensíveis, como os processos imunoquímicos (7-40).

Tal heterogeneidade levou a estabelecer como critério electroforético de identificação, um limite de mobilidade, para além do qual todos os acidentes devem considerar-se globulina γ . Assim, todas as fracções com mobilidade inferior a $-2,8 \times 10^{-5}$ cm²/seg/volt em tampão de veronal de pH 8,6 e concentração iónica 0,1 devem ser consideradas como pertencendo à fracção γ , do ponto de vista electroforético, é particularmente notável em certos soros patológicos, em que chega a ser difícil a distinção entre a fracção β e γ , como nalguns casos de cirrose hepática.

Esta circunstância é responsável pela descrição de acidentes anormais, não identificados — X. T. etc. — que aparecem, com certa frequência, nalgumas situações patológicas. Parece ser de bom critério, nestes casos duvidosos, incluir tais acidentes na fracção γ (3).

É relativamente fácil subdividir electroforéticamente a fracção γ nas fracções γ_1 e γ_2 , assim como evidenciar fracções intermédias (41).

A estas variações de mobilidade electroforética, correspondem variações idênticas do ponto iso-eléctrico, que vai de pH 6,3 a 7,6 segundo alguns autores (42).

O peso molecular anda à volta de 156.000 com cerca de 10 a 15 % do total da fracção apresentando peso molecular igual ou superior a 300.000 (9). Contém quantidades mínimas dos lípidos e de hidratos de carbono (42) e mostra, na sua composição em amino-ácidos, maior quantidade de serina e grupos básicos de que as outras fracções (cerca de 11,4 % de serina contra 8,1 % na fracção β e à volta de 5 % na fracção α e de 3 % na albumina) (43).

As moléculas da fracção γ tem uma forma muito alongada, com uma relação entre eixos de cerca de 1/9 ($350 \text{ \AA} \times 40 \text{ \AA}$).

O modo de produção da globulina γ tem sido objecto de investigação intensa, que a relaciona com o sistema reticulo-endotelial e os plasmocitos. Com efeito, verifica-se, na maioria das situações clínicas que interessam àquele sistema, como também na perturbação da produção de plasmocitos, uma variação acentuada da fracção γ . A este respeito, convém aqui apontar o interesse do estudo da produção de anticorpos, que parece relacionada com os plasmocitos, embora outras experiências tendam a atribuir um papel importante aos linfocitos. Em todo o caso, estudos recentes parecem demonstrar uma correlação íntima entre a produção de globulina do anticorpo e a proliferação de plasmocitos, assim como com as manifestações da actividade celular destes (44-45-46-47-48).

Verificou-se ainda uma escassez acentuada de plasmocitos nos casos de agamaglobulinémia, com incapacidade de resposta aos estímulos antigénicos (49). Não nos deteremos aqui sobre os mecanismos celulares de produção de anticorpos e de globulina γ acerca dos quais os interessados poderão consultar os trabalhos de Burnett e Fenner (50), Sevag (51) e Heidelberger (52).

Acerca das fracções proteicas do soro, no seu conjunto, podemos dizer, resumidamente, que a albumina é a fracção de menor peso molecular, a mais solúvel e mais rápida na sua migração num campo electroforético, ao passo que a globulina α é a mais lenta e, também, a globulina de maior interesse fisiopatológico. A albumina interfere, principalmente, na manutenção da pressão oncótica, enquanto a glo-

bulina α está intimamente relacionada com os processos orgânicos de imunidade. As fracções α e β são particularmente heterogêneas, estando aquela ligada aos processos inflamatórios agudos e neoplasias, e esta, por intermédio dos seus complexos lipoproteicos, às alterações do metabolismo dos lípidos. Este conjunto de propriedades e sua correspondência com as fracções isoladas pela técnica clássica da precipitação pelos álcoois, de Cohn, está resumido na figura 6 (53).

Os valores médios normais

Estudados os acidentes da curva normal e as fracções proteicas que os originam, chegou a altura de nos referirmos aos valores normais médios.

O estudo conjunto das médias dos valores obtidos por diversos autores trabalhando com a electroforese em papel de filtro (54 a 66), permitiu estabelecer, como médias de normalidade, os valores seguintes, que se apresentam com os limites estatísticos de variação (27).

Fracções	Valor médio em % do total	Limites de variação em % do total
Albumina	61,6	55,4 a 72,9
«Alfa» 1	3,9	1,4-4,4
«Alfa» 2	7,3	3,5-9,5
«Beta»	10,7	8,6-12,6
«Gama»	16,5	13,6-22,2

Também pelo estudo dos resultados de vários autores (55, 59, 64, 65, 66) se calcularam os seguintes valores médios dos desvios-padrão, que se indicam também com os limites de variação (27):

Fracção	Média dos desvios-padrão em %	Limites de variação em %
Albumina	$\pm 1,44$	0,38-2,34
«Alfa» 1	$\pm 0,53$	0,05-0,82
«Alfa» 2	$\pm 0,68$	0,07-1,06
«Beta»	$\pm 0,61$	0,11-1,10
«Gama»	$\pm 1,55$	0,19-1,80

Em valores absolutos, a média dos resultados obtidos em 58 soros, por electroforese em papel e determinação da proteinémia total, foram os seguintes (3):

Fracção	Valores em gr por 100 ml	Desvio-padrão
Albumina	4,99	0,17
«Alfa»	0,68	0,24
«Beta»	0,51	0,17
«Gama»	0,94	0,27

As variações fisiológicas destes valores são, em geral, pequenas num mesmo indivíduo adulto, pensando alguns que a constelação proteica viria a ser uma característica individual que se manteria, nas suas linhas gerais, através dos anos, em condições fisiológicas (67).

O estudo electroforético das proteínas do embrião humano (68) levam a admitir o aumento continuado da albumina desde os primeiros tempos da gestação até meses depois do nascimento, ao contrário do que acontece com a globulina α que, subindo progressivamente a níveis elevados até ao nascimento, cai nessa altura repentinamente, para atingir valores médios aos 2-3 meses. As globulinas α e β mantêm-se constantes durante o desenvolvimento do feto e sobem bruscamente depois da ingestão de colostro, para continuarem constantes nos primeiros meses de vida, em níveis mais elevados do que anteriormente (Fig. 7).

Depois do nascimento, os valores médios das fracções proteicas seriam os seguintes (70):

Idades	Valores em % do total				
	Albumina	«Alfa» 1	«Alfa» 2	«Beta»	«Gama»
Sangue do cordão	63,39	4,37	6,48	8,85	17,87
1-2 meses	55,21	5,26	11,91	11,62	15,36
3-4 meses	59,19	7,48	12,58	11,52	9,36
5-6 meses	57,80	5,85	11,82	10,92	11,92
7-24 meses	59,43	3,68	12,30	11,87	12,49
2-13 anos	63,37	3,40	8,06	13,56	12,09

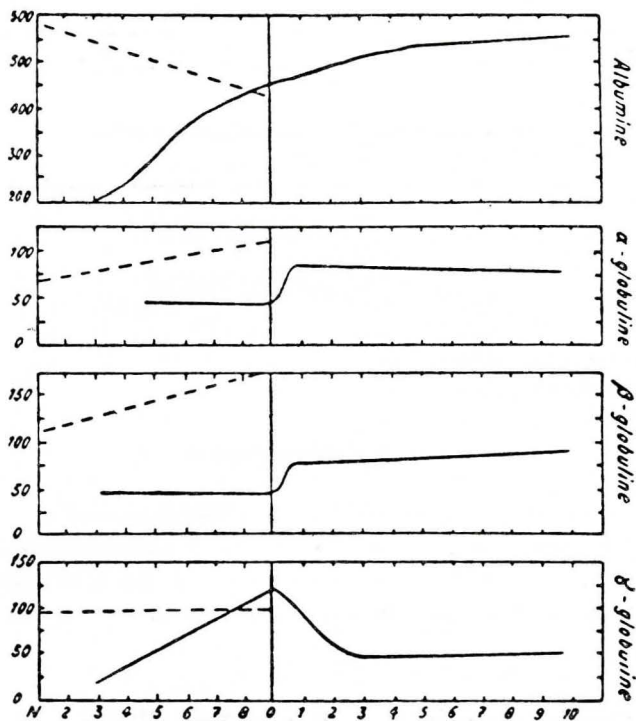


Fig. 7 — Variações das proteínas do soro, antes e depois do nascimento (Em ordenadas, valores planimétricos; em abscissas, meses de gestação — antes de O — e de idade — depois de O).

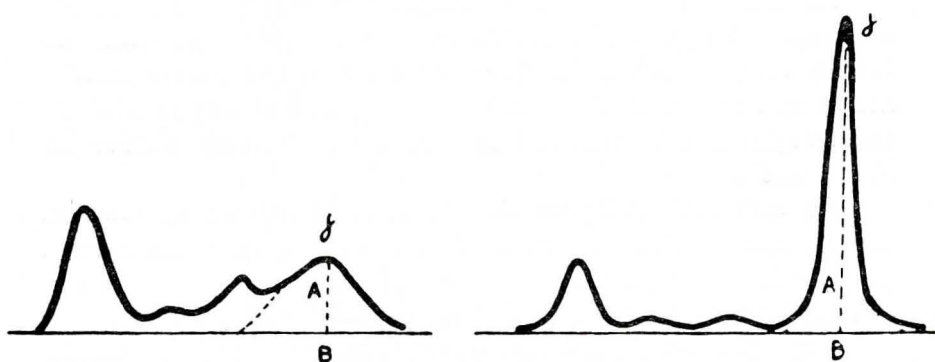


Fig. 8 — Curvas de electroforese com fracção γ heterogénea (cirrose, à direita) e homogénea (plasmocitoma, à esquerda).

Os valores absolutos das fracções, calculados a partir dos dados anteriores, podem resumir-se no quadro seguinte (3):

Idades	Valores em gr por 100 ml					
	Proteínas totais	Albumina	«Alfa» 1	«Alfa» 2	«Beta»	«Gama»
Sangue do cordão	6,67	4,23	0,29	0,43	0,59	1,19
1-2 meses	6,20	3,42	0,32	0,74	0,72	0,95
3-4 meses	6,37	3,77	0,48	0,80	0,72	0,60
5-6 meses	6,44	3,72	0,38	0,70	0,70	0,77
7-24 meses	6,53	3,88	0,23	0,80	0,77	0,81
2-13 anos	7,27	4,61	0,25	0,59	0,98	0,88

A partir dos quarenta anos parece haver diminuição da albumina com aumento da globulina γ , o qual se acentua para além dos 60 anos (71). Estudos feitos em individuos de idade superior a 80 anos, embora não por electroforese, deram os seguintes resultados (3):

Proteinémia total	4,42 gr p. 100 ml
Globulina α	0,72
» β	0,60
» γ	2,09

As variações devidas a diferenças nas condições ambientais não tem, até agora, sido suficientemente estudadas, devendo, em todo o caso, citar-se a influência da altitude, que parece relacionar-se com uma diminuição da globulina γ , sem alterações notáveis das fracções α e β , conforme resultados experimentais obtidos em cães (74-75).

As variações fisiológicas mais importantes ocorrem na gravidez onde, a uma descida na proteinemia total, corresponde uma descida progressiva da albumina, com aumento acentuado das fracções α e β , sem modificações notáveis da fracção γ (72-73) (Fig. 8).

Das diferenças individuais relacionadas com a raça, convém destacar o que se observa em populações africanas, onde se encontram valores elevados da proteinemia total, com aumento notável da

fracção α . Ainda recentemente tivemos ocasião de verificar o facto em observações feitas em algumas centenas de indígenas de Angola.

III — AS ALTERAÇÕES A CURVA NORMAL

Excluídas as situações em que a proteinémia total apresenta valores anormais por hemoconcentração ou hemodiluição, todas as alterações da proteinémia total se acompanham de descida relativa da albumina e subida das globulinas. Nestas, a que aumenta na maior parte dos casos, é a fracção α , que se mostra elevada em 78,9 % dos soros patológicos (3). Portanto, e como é do conhecimento geral, podem considerar-se, fundamentalmente, as hipoproteinémias devidas a hipoalbuminémia, com ou sem descida dos valores absolutos das globulinas, assim como as hiperproteinémias resultam, em geral, de aumento das globulinas, principalmente da globulina γ . Aumentos isolados e muito acentuados das outras fracções globulínicas, sem alteração da fracção γ , são, na maior parte das vezes, sinal de plasmocitoma. Tal facto é particularmente característico dos aumentos isolados da fracção β que, pode dizer-se, se não encontram fora dos casos de plasmocitoma β que, pode dizer-se, se não encontram fora dos casos de plasmocitoma β , sobretudo quando acompanhados de hiperproteinémia. Em 29 casos de aumento da fracção β para além de 2,7 gramas por 100 ml., 27 eram de plasmocitoma e os outros correspondiam a macroglobulinemia e a mielopatia (76).

A diminuição das fracções globulínicas também se relaciona principalmente, com a fracção γ . Convém notar que, na evolução dos casos patológicos que apresentam γ alta, a descida desta fracção só significa um regresso à normalidade, quando se acompanha de subida de albumina. Pelo contrário, a descida da fracção γ com albumina baixa, sobretudo quando simultânea a uma descida da proteinémia total, pode significar esgotamento orgânico, com diminuição das defesas e agravamento do prognóstico.

No que se refere às outras fracções, o abaixamento da fracção α pode considerar-se com algum interesse clínico nas hepatopatias. Com efeito, nas cirroses, o abaixamento da fracção α distingue-se das outras hepatopatias, em que a fracção α acompanha as variações da fracção γ .

1 — Alterações por aumento predominante de uma fracção

Sabendo que as disproteinémias se caracterizam sempre por abaixamento relativo da albumina com aumento das fracções globulínicas, é evidente que só estas deverão interessar-nos na revisão das situações com aumento predominante de uma fracção proteica. Dada a ordem de frequência dos aumentos isolados das fracções globulínicas, estudaremos, em primeiro lugar, os casos de aumento da fracção γ , seguidos dos que se traduzem por aumento das fracções α e β .

a — Aumento predominante da fracção γ :

Como já dissemos, a fracção γ é a maior responsável pelas situações de hiperproteinémia. O seu aumento está relacionado com processos patológicos em que haja reacção mesenquimatosa, com hiperprodução de células plasmáticas (3), traduzindo perturbação intrínseca dos órgãos produtores das proteínas. Neste aspecto, o aumento da globulina γ teria significado fisiopatológico idêntico à diminuição de albumina, ao passo que as alterações quantitativas das fracções α e β , seriam a tradução plasmática de perturbações localizadas fora dos órgãos produtores de proteína, como a alteração do equilíbrio proteico e extravascular, do tipo «nefroze», e as alterações tissulares extensas. Tal conceito implicaria a dualidade de sistemas proteicos no soro, um constituído pela albumina e pela globulina γ , e o outro pelas fracções globulínicas α e β . Daqui resultariam as noções de «disproteinémia de tipo central», afectando o primeiro sistema, e «disproteinémia do tipo periférico», relacionada com as fracções α e β , admitidas pelos autores que perfilham a hipótese da origem comum da albumina e da globulina γ (3).

Na apreciação dos acidentes da curva de electroforese, provocados por aumento acentuado da fracção γ , tem o maior interesse a averiguação do grau de homogeneidade electroforética da fracção. Por outras palavras, verificar se o aumento se traduz por um acidente agudo, de base estreita, ocupando, por vezes, só parte da extensão da tira de papel correspondente à fracção γ , como no plasmocitoma, ou se, pelo contrário, ocupará grande extensão da tira,

invadindo de modo apreciável a área da fracção vizinha, como é o caso de certas situações de cirrose (Fig. 8).

Nos *plasmocitomas de globulina γ* a alteração fundamental é a presença de um acidente homogéneo, normalmente muito acentuado, na zona correspondente à mobilidade dessa fracção, muitas vezes limitado à sub-fracção γ_1 ou γ_2 (Fig. 9). Num caso de Knedel (78), verificou-se aumento dos dois acidentes γ_1 e γ_2 , correspondendo aquele a uma crioglobulina, precipitável pelo frio e desaparecendo, portanto, do soro nessas condições (Fig. 9).

Este tipo de plasmocitoma pode considerar-se o mais frequente dos que se encontram em clínica (79-80), conforme mostram os números seguintes, referentes à frequência dos diversos tipos de plasmocitoma (81):

Tipo de curva	% de casos
Plasmocitoma de «alfa» . .	15
Plasmocitoma de «beta» 1. .	18
Plasmocitoma de «beta» 2. .	20
Plasmocitoma de «gama» . .	42
Curva aparentemente normal .	5

Encontram-se, nestas situações, os valores mais elevados, quer da proteinémia total, quer da fracção alterada (81), conforme se pode ver a seguir.

**Médias dos valores da proteinémia total
nos diferentes tipos de plasmocitoma**

Tipo de curva	Proteinémia total em gr por 100 ml
Plasmocitoma de «alfa» . .	6,6
Plasmocitoma de «beta» 1. .	9,2
Plasmocitoma de «beta» 2. .	8,8
Plasmocitoma de «gama» . .	10,0

**Valores médios das fracções proteicas nos diferentes tipos
de plasmocitoma**

Tipo de curva	Albumina	«Alfa»	«Beta» 1	«Beta» 2	«Gama»
Plasmocitoma de «alfa» em gr/100 ml	3,42	1,26	0,86	0,14	1,04
Em % do total	51,8	19,1	11,2	2,1	15,8
Plasmocitoma de «beta» 1 em gr/100 ml	2,63	0,60	5,02	0,16	0,70
Em % do total	28,6	6,5	54,8	1,80	7,6
Plasmocitoma de «beta» 2 em gr/100 ml	2,97	0,62	0,73	3,74	0,68
Em % do total	33,8	7,0	8,3	42,6	7,7
Plasmocitoma de «gama» em gr/100 ml	2,86	0,69	0,55	0,33	5,49
Em % do total	28,6	6,9	5,5	3,3	54,9

Em todo o caso, convém não esquecer a possibilidade do aparecimento de plasmocitoma de globulina γ com pequena alteração da proteinémia total.

A análise dos soros de plasmocitoma γ por ultracentrifugação mostrou, na maior parte dos casos, a ausência de componentes de peso molecular anormal. Só nalguns deles foi possível evidenciar a presença de componentes de constante de sedimentação mais elevada do que a média habitual da fracção γ (79-80). Parece, porém, não haver correspondência quantitativa entre a análise das fracções identificadas pelos dois processos: electroforese e ultracentrifugação. Para alguns autores, o plasmocitoma de γ corresponderia a situações clínicas com predominância de plasmocitos normais, enquanto os plasmocitomas relacionados com as outras fracções, estariam ligados à presença, em maior quantidade, de plasmocitos jovens e atípicos, mais acentuadamente nos plasmocitomas de α (81).

Curvas muito semelhantes às de plasmocitoma encontram-se nas situações de *macroglobulinémia* (80), em que as macroglobulinas apresentam mobilidades próximas das da fracção γ ou β . Nestas situações, a natureza da fracção anormalmente aumentada só pode

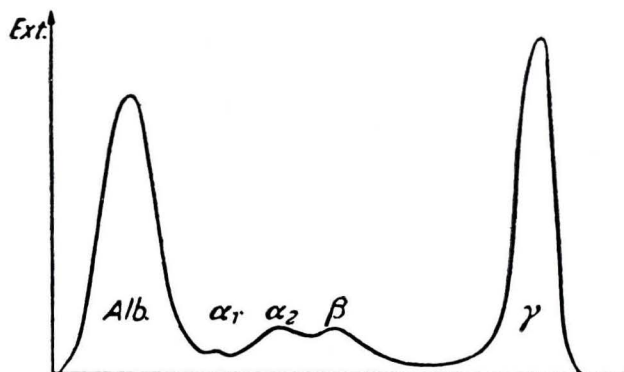


Fig. 9 — Curva de plasmocitoma de γ .

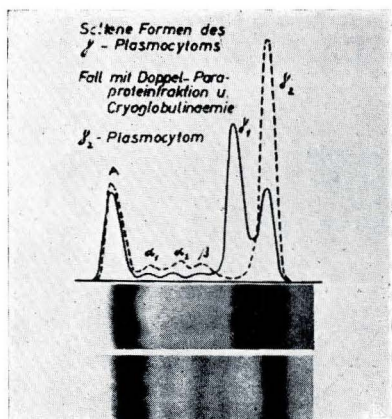


Fig. 10 — Plasmocitoma duplo de γ_1 e γ_2 .

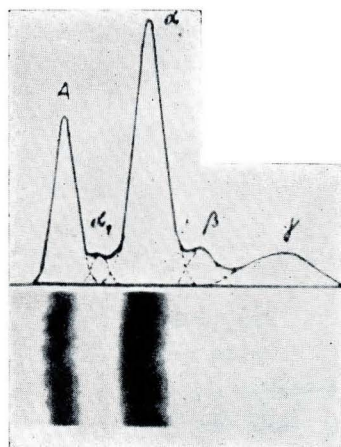


Fig. 11 — Curva de plasmocitoma de α_2 .

ser perfeitamente determinada por ultracentrifugação. Electroforéticamente tal distinção não é, praticamente possível, e só a exploração clínica cuidada pode contribuir para aclarar o diagnóstico.

As curvas de electroforese apresentando aumento acentuado da fracção γ de tipo heterogéneo encontram-se principalmente nas doenças do colagénico, nas infecções crónicas, nas cirroses, etc.

O aumento da globulina γ é de regra nos casos de *lúpus eritematoso disseminado*, atingindo, por vezes, valores muito elevados. A tal ponto que, sem o exame da curva que põe em evidência o carácter heterogéneo da fracção aumentada, seria justificável, nalguns casos pessoais, a suspeita de plasmocitoma. Porém, o acidente correspondente à fracção γ apresenta, em geral, uma base alargada demais para o que é habitual nestas situações.

A elevação da globulina α é menos acentuada, em geral, nas outras colagenoses, como a dermatomiosite e a periarterite nodosa. Na doença da Libman-Sachs, os valores da γ -globulinémia podem ser superiores a 40 % do total, como se vê nos resultados que se apresentam a seguir (82):

Fracções proteicas	Valores em % do total
Albumina	31,62
«Alfa»	3,41
«Beta»	15,15
«Gama»	40,79

Por vezes, o aumento de γ é acompanhado de elevação da fracção α , embora tal aumento não deva considerar-se constante.

Nas *infecções de tipo crónico* o aumento da fracção γ é variável de intensidade e estaria relacionado com a produção, mais intensa nestes casos, de globulina de anticorpo. Em todo o caso, convém acentuar que o aumento da fracção γ não parece, só por si, uma indicação do grau de imunidade.

Por vezes, a hipergamaglobulinémia acompanha-se de descida muito acentuada da albumina, que pode traduzir-se por hipoprotei-némia total (3). Também nestas situações de infecção crónica (sífilis,

paludismo, schistosomiase, etc.) se pode encontrar aumento simultâneo da fracção α , variando de intensidade durante a evolução do processo patológico.

Na *tuberculose* observar-se-ia um aumento discreto da fracção α , que, com a progressão da infecção se acompanharia de aumento da fracção α e, mais tarde, de todas as fracções globulínicas com proteinémia total dentro de valores normais (87). Alguns relacionam o aumento da fracção α com o carácter exsudativo do processo e o aumento do acidente γ com o tipo fibroso, crónico (88).

Tem interesse a indicação dos resultados obtidos nas *endocardites lentas*, em que o aumento da fracção γ parece relacionado com a ausência de bacteriémia. Com efeito, nesta situação de endocardite sem bacteriémia, observa-se, em geral, um aumento relativamente homogéneo e marcado da fracção γ . A homogeneidade da fracção não é tão acentuada como no plasmocitoma ou no kala-azar, mas, apesar disso, é mais evidente do que nas cirroses. Pelo contrário, nas situações de endocardite lenta com bacteriémia, as alterações são muito menos marcadas e falta o aumento característico da fracção γ . Indicamos a seguir os valores médios obtidos em 20 casos de endocardite lenta, calculados a partir de (3):

Fracções proteicas	Tipo de endocardite	
	Com bacteriemia	Sem bacteriemia
Albumina	57,3 %	42,2 %
Globulina «alfa» 1	3,8 »	3,9 »
Globulina «alfa» 2	7,5 »	7,0 »
Globulina «beta»	8,4 »	7,5 »
Globulina «gama»	38,5 »	21,2 »

É de acentuar, em todo o caso, não ser possível estabelecer regras rígidas nem valores fixos para as diversas situações patológicas. Encontram-se casos em que as curvas não se assemelham aos tipos indicados, os quais constituem, apenas, a média dos valores mais frequentes.

Ainda no que se refere a infecções crónicas, apresentando aumentos da fracção γ , pode citar-se o caso da *brucelose* em que, no entanto, é difícil encontrar um quadro electroforético típico da infecção.

Tem importância, a este respeito, assinalar o que se passa com o *kala-azar*. Nesta doença encontra-se aumento marcado da fracção γ , por vezes acompanhado de aumento da globulina α . O que, porém, tem o maior interesse é a verificação de que o aumento se relaciona com os componentes mais lentos da fracção γ , apresentando-se a curva, quando comparada com a normal, com o acidente γ predominante mais perto da posição de partida do que nesta (83). Por outras palavras, a curva de *kala-azar* mostra aumento predominante da sub-fracção γ_2 , com ou sem aumento da fracção α . Este facto tem importância no diagnóstico diferencial com a cirrose esplenomegálica, em que o acidente correspondente à fracção γ apresenta características de heterogeneidade marcadas, sendo por vezes difícil a sua distinção da fracção β . No *kala-azar*, o aumento de γ_2 torna os dois acidentes perfeitamente individualizáveis e distintos: o da fracção γ , aumentado e o da fracção β , normal.

A análise seriada de curvas de electroforese em papel tem muito interesse no estudo da evolução da doença, visto o regresso da curva à normalidade ser um índice de bom prognóstico, até por ser mais tardio do que, em geral, o desaparecimento dos outros sinais, como a febre. Por outro lado, a persistência de uma curva de electroforese anormal, após o desaparecimento dos outros sinais de doença, obriga a pensar na persistência do processo mórbido e indica a necessidade de manter uma vigilância cuidadosa do doente até à normalização da curva.

Também nos casos de *linfogramuloma venéreo* e na *sarcoidose* se encontram habitualmente aumentos mais ou menos marcados da fracção γ .

Outra situação, já citada por várias vezes, de aumento de globulina γ é a *cirrose hepática*, nos seus diversos tipos. Como característica comum pode apontar-se a heterogeneidade da fracção aumentada, traduzida por um acidente de base alargada.

Nas cirroses de tipo biliar, o aumento da fracção γ acompanha-se de aumento da fracção β , que, para alguns, seria característico da situação (84). Na cirrose post-hepatítica e na do tipo Laennec, não se verifica aumento apreciável da fracção β e, ao contrário do que pode acontecer na cirrose esplenomegálica, sobretudo nas fases iniciais (8), há tendência marcada para a hipoalbuminémia (3).

A fracção α raramente está aumentada. Quando isso acontece,

significa, em geral, presença concomitante de complicação do tipo infeccioso. Alguns apontam mesmo como característica de cirrose, a baixa da fracção α com aumento de γ (77).

Também nestas situações a electroforese é um precioso auxiliar do diagnóstico. Com efeito, nos casos suspeitos, apresentando manifestações clínicas e dados laboratoriais concordantes, a verificação, pelo estudo electroforético das proteínas do soro, de um aumento considerável da fracção α , de tipo heterogéneo, sem aumento marcado das fracções α e β , ou discreto desta última, confirma o diagnóstico. Pelo contrário, um aumento discreto da fracção γ , acompanhado de aumento das fracções α e β , torna o diagnóstico duvidoso e fará pensar num processo neoplásico ou numa complicação extra-hepática. É preciso, porém, não esquecer que o aumento pouco acentuado da fracção γ , acompanhado de descida muito marcada da albumina, não infirma o diagnóstico de cirrose, quando se verifica hipoproteinémia simultânea (3).

Do ponto de vista prognóstico, o estudo das curvas de cirrose tem o maior interesse, dado que um processo de hepatite que evolui com aumento muito marcado da fracção γ , sem tendência para regressar aos valores normais, faz pensar na evolução para a transformação cirrótica. Para alguns, o aumento da fracção γ daria indicações acerca do tipo de hepatopatia: parenquimatosas, as que evoluem sem aumento acentuado de γ ; mesenquimatosas, as que apresentam elevação marcada da fracção (86). No primeiro grupo estariam incluídas as icterícias de retenção e no segundo as cirroses, hepatites e hemo-cromatose.

Nas *hepatites*, a curva de electroforese parece variar com a evolução do processo. As curvas com acentuação de acidente γ encontrar-se-iam nas fases tardias da doença, enquanto nas primeiras fases seria a fracção β que começaria por aumentar. A proteinémia total varia, em geral, dentro de limites normais e é a acentuação do acidente γ que marca, de algum modo, a gravidade da situação e tipo de evolução, conforme se disse atrás. Os valores da fracção γ são os últimos a regressar à normalidade e mantêm-se aumentados para além da regressão de toda a sintomatologia clínica e laboratorial. O estudo seriado de curvas de electroforese, permite firmar o prognóstico e a terapêutica em bases mais seguras do que o conhecimento dos resultados das provas habituais de laboratório.

Nas *ictericias de retenção*, a curva não apresenta alterações notáveis, excepto as que se relacionem com a causa da obstrução (neoplasia, p. e.).

Não terminaremos este capítulo sem nos referirmos à *insuficiência cardíaca congestiva*, na qual se observa um aumento nítido da fracção γ , com aumento pouco acentuado das fracções β e α , e sem alteração notável da proteinémia total (89). Este tipo de curva, que pode assemelhar-se ao da cirrose hepática, estaria relacionado com a repercussão hepática da estase (90).

b — Aumento predominante da fracção α :

As situações em que predomina o aumento da fracção α , são geralmente do tipo dos processos inflamatórios e infecciosos agudos, sobretudo acompanhados de destruição ou alteração tissular extensa. Por outras palavras, pode considerar-se o aumento da fracção α , principalmente no que se refere à sub-fracção α_2 , como um sinal electroforético de «stress», relacionado com o aumento de alguns dos componentes da fracção, como a proteína C-reactiva e as glucoproteínas.

O que acaba de dizer-se justifica a importância do estudo electroforético das proteínas em situações com o *enfarto do miocárdio*. Nesta situação patológica o estudo das variações da fracção α pode dar indicações sobre a actividade do processo e tem interesse do ponto de vista do prognóstico e da terapêutica. Com efeito, parece que, numa primeira fase, se observaria aumento da fracção β e que, aos 2-3 dias de evolução, se seguiria um aumento progressivo e intenso da fracção α , mantendo-se a fracção β em valores pouco elevados e a γ sem alteração. Na evolução para a cura assiste-se a um abaixamento de α e β , seguido de aumento da fracção γ e regresso à normalidade. A normalização da fracção α dar-se-ia por volta do segundo mês, nos casos de evolução benigna. O recrudescimento do processo anunciar-se-ia por um aumento subsequente desta fracção, o qual, a manter-se, seria um sinal de mau prognóstico. Este aumento secundário da fracção α durante a evolução da doença teria maior valor prognóstico do que o que se observa no início do processo patológico, altura em que o aumento da fracção α não está em relação, nem com a extensão, nem com a localização da lesão (91).

Dentre os processos inflamatórios agudos, convém destacar a *febre reumática*, em que, no período agudo, se encontra aumento acentuado da fracção α , o qual, depois, se acompanha de aumento de γ mais ou menos marcado. Esta subida da fracção γ encontra-se também na *poliartrite crónica*, sobretudo na segunda fase da doença. Com efeito, parece não haver diferença significativa entre as curvas de electroforese na febre reumática e na poliartrite crónica (92). Em ambas estão aumentadas as fracções α e γ , aquela na primeira fase, aguda, e esta com maior frequência, no período de cronicidade.

Na *pneumonia* encontra-se outro exemplo de infecção aguda manifestada por aumento predominante da fracção α na curva de electroforese. Aqui também o aumento de α se acompanha, nas fases mais avançadas da evolução, de um aumento de γ . O aumento da fracção α corresponderia, neste caso, à fase de predomínio dos processos exsudativo-necróticos (93).

Quanto aos *processos neoplásicos*, deve citar-se o aumento nítido da fracção α , ou melhor, da sub-fracção α_2 com variações pouco características da fracção γ . Esta mostra, por vezes, tendência à diminuição, excepto nas situações com metastases hepáticas (87), em que se verifica hipergamaglobulinémia. Nestes casos, tem interesse o estudo simultâneo das glucoproteínas, que costumam apresentar-se aumentadas.

Chegou a altura de falarmos de uma situação em que o aumento da fracção α se acompanha de diminuição marcada da fracção γ : a *nefrose*. Nesta situação encontra-se diminuição muito acentuada da albumina, grande aumento de α_2 , aumento discreto da fracção β e descida da fracção γ (2-12-94-95), conforme se mostra nos valores médios seguintes, calculados a partir de (3):

Fracções proteicas	Valores em % do total
Albumina	14,1
Globulina «alfa» 1	4,9
Globulina «alfa» 2	49,1
Globulina «beta»	15,3
Globulina «gama»	16,6

Tem interesse neste caso o estudo electroforético da urina, onde se encontram aumentadas as fracções diminuídas no soro, ao contrário do que acontece, por exemplo, nos plasmocitomas, em que está aumentada na urina a mesma fracção que se encontra aumentada no soro. O aumento da fracção γ na urina seria sinal de mau prognóstico na nefrite, indicando tendência para a nefrose com evolução para a insuficiência renal (96).

Entre as situações com tendência para aumento predominante da fracção α encontram-se as *toxicoses grávidas*. Aqui, acentua-se a tendência para o aumento da fracção α e abaixamento da γ indicados para a gravidez normal, com diminuição mais acentuada da albumina. As variações da fracção β seriam pouco significativas (73).

Também se encontra aumento predominante da fracção α , acompanhado de hipoproteinémia e diminuição acentuada da albumina nos casos de *sprue* (97).

Por último, diremos algumas palavras acerca do *plasmocitoma de α* , que se apresenta como o mais raro dos 3 tipos de plasmocitoma clássicos (Fig. 11). Seria o tipo apresentando maior malignidade, por mais curta evolução, e apresentaria a maior atipia celular de todos os tipos de plasmocitoma (97).

É, por vezes, difícil, fazer o diagnóstico electroforético do plasmocitoma de α , porque nos casos com grande aumento desta fracção, as fracções β e γ podem estar, praticamente, ausentes, como se vê nos valores seguintes (98), o que leva a pensar na possibilidade de, nesses casos, se tratar de um plasmocitoma com hiperprodução de globulina γ muito atípica, apresentando mobilidade electroforética semelhante à da fracção α normal (3).

Fracções proteicas	Caso I	Caso II
Albumina	26,5 %	23,9 %
Globulina «alfa» 1	5,4 »	3,3 »
Globulina «alfa» 2	68,1 »	72,8 »
Globulina «beta»	0,0 »	0,0 »
Globulina «gama»	0,0 »	0,0 »

c — Aumento predominante da fracção β :

O aumento isolado da fracção β é quase patognomónico de *plasmocitoma*, quando se acompanha de hiperproteinémia e é muito acentuado e homogéneo.

Esta situação encontra-se com maior frequência do que o plasmocitoma de α , mas é mais rara do que o plasmocitoma de γ . Discutem alguns (99) a natureza da fracção aumentada que, embora apresentando a mobilidade da fracção β se comportaria, perante outros métodos de investigação, como uma globulina γ . Apoiaria esta opinião a ausência da hiperlipemia que costuma acompanhar os aumentos da fracção β , ligados, em geral, a aumento de lipoproteínas (80). Por outro lado, a ultracentrifugação, nos casos de plasmocitoma de β , não mostra aumento dos componentes de constante de sedimentação elevada, mas, antes, o aumento incidiria sobre o componente de constante de sedimentação $S_{20} = 7$ Svedberg, semelhante ao da maior parte da fracção γ (80). Acresce o facto de, nestas situações, a fracção γ estar diminuída ou quase ausente, sendo difícil, por isso, a identificação das fracções aumentadas sobretudo na destrição entre β_2 e γ_1 . Nestes factos se apoiam os que pensam que os casos de plasmocitoma β corresponderiam, como se disse antes acerca do plasmocitoma de α , a hiperprodução de globulina γ com comportamento anormal, do ponto de vista electroforético, mas pertencendo nitidamente à fracção γ pelo conjunto das suas outras características (3). Esta hipótese explicaria as curvas de plasmocitoma com aumento de fracções intermédias entre β e γ (79), que corresponderiam a alterações menos acentuadas da globulina do plasmocitoma.

Para além dos plasmocitomas de β , os aumentos desta fracção encontram-se, principalmente, na *arteriosclerose* (100) e nas situações com perturbação do metabolismo dos lípidos, em que tal aumento pode relacionar-se com o aumento das lipoproteínas β .

2 — Alterações por diminuição predominante de uma fracção

Neste capítulo pomos de parte as diminuições de albumina que, como se disse, são a regra em todas as disproteinémias com hipoproteinémia. Mesmo nas que se apresentam com hiperproteinémia, a diminuição relativa da albumina acompanha as alterações das outras

fracções, como regra fixa. Por outro lado, a diminuição isolada de albumina, sem alteração das outras fracções, só é conhecida num único caso da literatura, em que faltava por completo (101). Por este motivo, a baixa da albumina, só por si, não parece uma alteração da curva de electroforese com significado diagnóstico especial.

Já falámos no valor prognóstico que tem a subida da albumina acompanhando a descida das globulinas nas disproteinémias com hiperglobulinémia. Voltamos a insistir que a normalização da fracção γ , com diminuição das proteínas totais e hipoalbuminémia absoluta, significa esgotamento orgânico e incapacidade funcional dos órgãos produtores de proteínas.

A diminuição acentuada da fracção γ tem um interesse muito particular nos processos infecciosos arrastados, em que a falência dos mecanismos de resistência se traduz por passagem das curvas de hipergamaglobulinémia às de hipogamaglobulinémia e, mesmo, à ausência de globulina γ circulante (3).

Nas crianças, nas quais há tendência para valores baixos da fracção γ , como vimos ao tratar das variações da curva normal com a idade, são particularmente importantes as situações de hipo ou agamaglobulinémia em crianças com acidentes infecciosos repetidos (102-103). A revelação destas situações só foi possível depois da utilização das técnicas de electroforese. Por elas se verifica, também, que a estimulação antigénica dos doentes nestas condições, não é capaz de provocar a produção de anticorpos nem o aparecimento de globulina γ no soro. Pensa-se que os casos de agamaglobulinémia congénita sejam do tipo hereditário, com carácter recessivo ligado ao sexo, por se encontrarem somente em crianças do sexo masculino.

IV — CONSIDERAÇÕES FINAIS

Passámos em revista, com o estudo da curva normal de electroforese e do modo de representação dos resultados, as principais alterações com interesse diagnóstico e prognóstico. Não queremos terminar sem insistir na ausência de especificidade dos resultados. Com efeito, para além de alguns raros casos de curvas típicas (certos plasmocitomas, por exemplo), a electroforese não fornece, só por si, um diagnóstico definitivo. É necessária a integração criteriosa dos resul-

tados fornecidos por esta técnica no conjunto dos dados clínicos e laboratoriais que seja possível colher em cada caso. Mas, no plano geral do estudo clínico e laboratorial de grande número de quadros patológicos cabe à electroforese um papel do maior valor, quer na investigação quer na prática diária, quando os seus resultados sejam obtidos por técnica rigorosa e interpretados com são critério clínico. Pela sua mesma simplicidade técnica e facilidade aparente na obtenção dos resultados, a electroforese das proteínas em papel de filtro obriga a um rigor de técnica e cuidado de interpretação sem os quais os resultados obtidos devem considerar-se como destituídos de significado, pela possibilidade de erros grandes na sua apreciação quantitativa, a que aludimos no primeiro trabalho desta série. Porém, nas mãos de técnicos bem treinados na execução e interpretação, a electroforese não oferece dificuldades e pode considerar-se indispensável, hoje, ao conhecimento concreto da maioria das situações clínicas. Se este trabalho puder ser de utilidade a alguns colegas, por vir a facilitar-lhes o recurso a tão útil técnica, teremos atingido, por completo, o fim que tivemos em vista ao escrevê-lo.

V — BIBLIOGRAFIA

- 1 — FRANCO, A. P. — Anais do I. M. T. — Inform. Bibliogr., 13: 1, 3, 1956.
- 2 — FLYNN, F. e P. DE MAYO — Lancet, 21. 235, 1951.
- 3 — GRAS, J. — Proteínas plasmáticas — Ed. JIMS, Barcelona, 1956.
- 4 — CROOK, E. M., H. HARRIS, FATMA ASSAN e F. L. WARREN — Biochem. J., 56: 434, 1954.
- 5 — MACDONALD, H. J., E. P. MARBACH e M. C. URBIN — Clin. Chem., 5: 17, 1953.
- 6 — DURRUM, E. L., M. H. PAUL e E. R. B. SMITH — Science, 116, 428, 1952.
- 7 — WILLIAMS, C. A. e P. GRABAR — J. Immunol., 74: 397, 1955.
- 8 — CARPENTER, P. L. — Immunology and serology — W. B. Saunders, Londres, 1956.
- 9 — ONCLEY, J. L., G. SCATCHARD e A. BROWN — J. Phys. Coll. Chem., 51: 184 — 1947.
- 10 — TISELIUS, A. — Biochem. J., 31: 1464, 1937.
- 11 — ARMSTRONG, S. H., M. J. E. BUDKA e K. M. MORRISON — J. Amer. Chem. Soc., 69: 416, 1947.
- 12 — KUNKEL, H. e A. TISELIUS — J. Gen. Physiol., 35: 89, 1951.
- 13 — ROTHEN, A. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 43: 229, 1942.

- 14 — COHN, E. J. e al. — J. Amer. Chem. Soc., 72: 465, 1950.
- 15 — RIMINGTON, C. e M. VAN DEN ENDE — Biochem. J., 34: 941, 1940.
- 16 — COHN, E. J. e al. — J. Amer. Chem. Soc., 68: 459, 1946.
- 17 — HUGENBLOER, F., CH. WUNDERLY e G. SCHNEIDER — Klin. Wschr., 29: 705, 1951.
- 18 — MILLER, L. L., C. G. BLY, M. C. WATSON e W. P. BALE — J. Exp. Med., 94: 431, 1951.
- 19 — MILLER, L. L. e W. F. BALE — J. Exp. Med., 99: 125, 1954.
- 20 — MILLER, L. L., C. G. BLY e W. F. BALE — J. Exp. Med., 99: 133, 1954.
- 21 — GRAS, J. e A. FOZ — Rev. Esp. Fisiol., 7: 87, 1951.
- 22 — FARKAS, G. VON — Cit. em (3).
- 23 — JAYLE, M. F. e J. BADIN — C. R. Soc. Biol., 144: 1475, 1950.
- 24 — LARSON, F. C., W. P. DEISS e E. C. ALBRIGHT — J. Clin. Inv., 33: 230, 1954.
- 25 — MEHL, J. W., J. HUMPHREY e R. J. WINZLER — Prod. Soc. Exp. Biol. Med., 72: 106, 1949.
- 26 — BERGSTERMANN, H. — Cit. in (27).
- 27 — WUNDERLY, CH. — La electroforesis en papel — Trad. da 1.^a ed. alemã — Ed. Científico-Médica, Barcelona, 1956.
- 28 — MEYER, K. — In: Advance in protein chemistry, vol. II — Academic Press, N. Y., 1945.
- 29 — GURD, F. R. N., J. L. ONCLEY, J. T. EDSALL e E. J. COHN — Faraday Soc. Disc., 6: 70, 1949.
- 30 — PEDERSEN, K. O. — Ultracentrifugal studies on serum and serum fractions — Almqvist, Uppsala, 1945.
- 31 — MACFARLANE, H. S. — Faraday Soc. Disc., 6: 74, 1949.
- 32 — FRAZER, A. C. — Faraday Soc. Disc., 6: 81, 1949.
- 33 — KRUEGER, R. C. e M. HEIDELBERGER — J. Exp. Med., 92: 383, 1950.
- 34 — ORLANS, E. S. — Br. J. Exp. Path., 33: 451, 1952.
- 35 — BOYER, P. D., G. A. BALLOU e M. LUCK — J. Biol. Chem., 167: 407, 1947.
- 36 — WUNDERLY, CH. — Kolloid Z., 117: 137, 1950.
- 38 — WUNDERLY, CH. — Nature, 165: 850, 1950.
- 39 — WUNDERLY, CH. — Nature, 169: 932, 1952.
- 40 — GRABAR, P. — Etude des gamma-globulines — G. Doin, Paris, 1954.
- 41 — COHN, M., H. F. DEUTSCH e L. R. WETTER — J. Immunol., 64: 381, 1950.
- 42 — ONCLEY, J. L. — Blood cells and plasma proteins — Academic Press, N. Y., 1953.
- 43 — PERNIS, B. — Plasma, 1: 365, 1953.
- 44 — MAC NEIL, C. — J. Immunol., 65: 359, 1950.
- 45 — MARSHAL, A. H. E. e R. G. WHITE — Br. J. Exp. Path., 31: 157, 1950.
- 46 — MOESCHLIN, S., J. R. PELAEZ e F. HUGENBLOER — Acta Haemat., 6: 321, 1951.
- 47 — MAKINODAN, T., R. F. RUTH e H. R. WOEFEL — J. Immunol., 72: 39, 1954.
- 48 — WHITE, R. G. — Br. J. Exp. Path., 35: 365, 1954.
- 49 — GOOD, R. A. — J. Lab. Clin. Med., 46: 167, 1955.
- 50 — BURNETT, M. — The production of antibodies — Macmillan, Melbourne, 1949.

- 51 — SEVAG — Immunocatalysis — Ch. C. Thomas, Springfield, 1951.
- 52 — HEIDELBERGER, M. — In: The nature and significance of the antibody response — Columbia Univ. Press, N. Y., 1953.
- 53 — ONCLEY, J. L. e al. — Ann. N. Y. Acad. Sci., 46: 889, 1946.
- 54 — PLUECKTHUN, H. e H. GOTTING — Klin. Wschr., 29: 415, 1951.
- 55 — GRASSMAN, W. e K. HANNIG — Z. Physiol. Chem., 290: 1, 1952.
- 56 — KOIW, E., G. WALLENIUS e A. GRONWALL — Btll. Soc. Chim. Bioll. 33: 194, 1951.
- 57 — GRAS, J. — Rev. Esp. Fisiol., 8: 59, 1952.
- 58 — CASPANI, R. e C. BERNASCONI — Minerva Med., 43: 1289, 1952.
- 59 — SOMMERFELT, S. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 4: 307, 1952.
- 60 — GOA, J. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 3: 236, 1951.
- 61 — BRANTE, G. — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 4: 293, 1952
- 62 — ESSER, H., F. HEINZLER e H. WILD — Klin. Wschr., 31: 321, 1953.
- 63 — ANTONINI, F. e G. PIVA — Rec. Progr. Med., 15: 243, 1953.
- 64 — KNAPP, A. e Z. SEILER — Z. inn. Med., 8: 741, 1953.
- 65 — SONNET, J. e J. RODHAIN — Rev. Belge Path., 22: 226, 1952.
- 66 — BOGDANOWICZ, G., P. OSINSKI e F. STEIN — Acta Clin. Belge, 8: 585, 1953.
- 67 — LLINARES, L. M. — Comunicação ao XXIV Congr. Luso-Espanhol para o Progr. Ciências, Coimbra, 1956 (em publ.).
- 68 — MARTIN DU PAN, R. e D. MOORE — Ann. Paediatr., 171: 290, 1948.
- 69 — MARTIN, N. H. — Lancet, 267: 1094, 1954.
- 70 — CASPANI, R., M. NEGRI e C. STICCA — Minerva Paediatr., 5: 1, 1953.
- 71 — MANZONI, RAVIZZA, RIVOLTA e SCARSELLA — Riv. Geront. Cariat., 2: 201, 1952.
- 72 — GLATTHAAR, E., H. SVENDERHAUF e CH. WUNDERLY — Schweiz. Med. Wschr., 81: 592, 1951.
- 73 — MACY, I. G. e H. C. MACK — Physiologic changes in plasma protein characteristic of human reproduction — Children Fund. Michigan, 1953
- 74 — MALMEJAC, S. CRUCK, A. GROSS e G. NEVERRE — Algerie Med., 50: 354, 1947.
- 75 — MALMEJAC, J., S. CRUCK e G. NEVERRE — Bull. Acad. Nat. Med., 132: 92, 1948.
- 76 — WUHRMAN, F., CH. WUNDERLY, P. NICOLA e F. HUGENBLOER — Helv. Med. Acta, 17: 197, 1950.
- 77 — GORDON, E. e R. V. WEBER — Canad. J. Med. Sci., 31: 45, 1953.
- 78 — GRASSMANN, W. — In: Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis. J. A. Churchill, Londres, 1956.
- 79 — RUNDLESS, W., G. COOPER e R. W. WILLET — J. Clin. Inv., 30: 1125, 1951.
- 80 — WALDENSTROM, J. — Adv. Int. Med., 5, 398, 1952.
- 81 — WUHRMANN, F., CH. WUNDERLY e F. HUGENBLOER — Dtsch. Med. Wschr., 74: 681, 1949.
- 82 — DONZELOT, E., H. KAUFFMANN e S. MENDE — Bull. Soc. Med. Hop. Paris, 65: 483, 1949.

- 83 — OPPENHEIMER, W. e J. PRATS — Arch. Paediatr., 3: 299, 1952.
- 84 — KUNKEL, H. G. e E. H. AHRENS — J. Clin. Invest., 28: 1575, 1949.
- 85 — ROFF CARBALLO, J. — Disproternemias — Paz Montalvo, Madrid, 1953.
- 86 — POLI, E., R. CASPANI, S. JUCKER e A. M. VILLA — Minerva Med., 44: 42, 1953.
- 87 — SEIBERT, F. B., M. U. SEIBERT, A. J. ATNO e H. W. CAMPBELL — J. Clin. Invest., 26: 90, 1947.
- 88 — JAHNKE, K. e W. SCHOLTAN — Z. Exp. Med., 116: 13, 1950.
- 89 — ORTIZ, J., J. GONZALEZ e J. OTERO DE LA GANDARA — Rev. Clin. Esp., 52: 24, 1954.
- 90 — ANTONINI, F. M. e G. PIVA — Rec. Progr. Med., 14: 258, 1953.
- 91 — SONNET, J. e A. SIBILLE — Acta Cardiol., 8: 749, 1953.
- 92 — SCHULER, B. — Die quantitative Elektrophorese in der Medizin — Springer Berlin, 1952.
- 93 — POLI, E. — Fisiopatologia e clinica del Protidoplasma — Delfino — Milão, 1951.
- 94 — GRASSMANN, W., K. HANNIG e M. KNEDEL — Dtsch. Med. Wschr., 76: 333, 1951.
- 95 — KOIW, E., G. WALLENNIUS e A. GRONWALL — Scand. J. Clin. Lab. Invest., 4: 47, 1952.
- 96 — CASPANI, R. — Plasma, 1: 343, 1953.
- 97 — WUHRMANN, F. e CH. WUNDERLY — Dit Bluteiweisskorper des Menschen — Benno Schwabe, Basileia, 1951.
- 98 — SNAPPER, I., L. B. TURNER e H. L. MOSCOVITZ — Multiple myeloma — Grunne & Stratton, N. Y., 1953.
- 99 — GRAS, J. e M. SALAZAR — Plasma, 2: 1, 1954.
- 100 — BARR, D. P., E. M. RUSS e H. A. EDER — Amer. J. Med., 11: 468, 1951.
- 101 — BENNOLD, H. — Cit. in (78).
- 102 — BRUTON, O. — Pediatrics, 9: 722, 1952.
- 103 — JEAN, R. — Presse Med., 61: 828, 1953.

Imprensa Portuguesa ★ Rua Formosa, 108-116 ★ PORTO