

ELETROFORESE SÔBRE ACETATO DE CELULOSE (CAF).
REPRODUTIBILIDADE E VALORES NORMAIS ⁽¹⁾

CELLULOSE-ACETATE ELECTROPHORESIS (CAF). REPRODUCIBILITY
AND RANGE OF NORMALITY

CELIDÉIA A. COPPI VAZ ⁽²⁾
RUBENS GUILMARÃES FERRI ⁽³⁾
NIKOLAUS GEISDHOFEL ⁽⁴⁾
ALCIRA NANCY DE PAULA CAMPOS ⁽⁵⁾

S U M M A R Y

The authors present a study of the reproducibility of the cellulose-acetate electrophoresis and the establishment of the range of normality for each component by statistical analysis.

Comparative analysis were made by paper and cellulose-acetate electrophoresis with the same samples.

Reproducibility of the method was considered excellent when carefully used.

The authors' results were very similar to those obtained by Knedel, and to the Tiselius' free electrophoresis.

INTRODUÇÃO

Acetato de celulose foi introduzido para substituir o papel de filtro como suporte para eletroforese, principalmente por não adsorver proteína como o primeiro. Em virtude disto não se forma, durante a migração, um tapete de Albumina (trailing) sobre o qual migram as frações menos rápidas. Os componentes se localizam em faixas mais definidas e a separação permite uma densitometria mais exata em virtude da excelente transparência e ausência de coloração de fundo (back-ground). No caso do papel, a albumina adsorvida contribui para diminuir o valor deste componente no eletroferograma.

Pelos métodos inicialmente propostos para eletroforese sobre acetato, como os de KOHN⁷, utilizavam-se faixas largas e a densitometria se fazia nos aparelhos convencionais tornan-

do o método dispendioso, razão pela qual vários modelos de aparelhos têm permitido ultimamente a realização de microtécnicas, com grande economia de acetato de celulose e de todos os reagentes.

Mais recentemente KNEDEL⁶ propôs modificações na metodologia de trabalho com acetato de celulose utilizando densitômetro especialmente construído, de modo a permitir leitura de extinção de zero a 1,1, muito embora seja mais aconselhável a utilização da faixa de extinção de zero a 0,8. Em virtude disto, a quantidade de proteína a ser aplicada fica extremamente reduzida em relação aos métodos convencionais; no caso de soro, aplicam-se aproximadamente 0,05 microlitros.

TAUCH⁹ estudou a reprodutibilidade e selecionou corantes verificando que no caso

(1) Realizado no Centro de Pesquisas Imunoquímicas da Fac. Med. Univ. São Paulo.

(2) Do Instituto de Biociências da U.S.P.

(3) Responsável pelo Centro de Pesquisas Imunoquímicas do Depto. Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

(4) Diretor do Depto. de Assistência Técnica da Carl Zeiss Cia. — Óptica e Mecânica.

(5) Do Centro de Pesquisas Imunoquímicas da Fac. Med. Univ. São Paulo.

do amidoschwarz 10 B a relação entre absorção de corante e quantidade de proteína é praticamente linear, seguindo a lei de Lambert e Beer.

Como os valores da literatura se referem a populações de outros países, realizamos no Centro de Pesquisas Imunoquímicas um estudo de reprodutibilidade ao lado do estabelecimento da faixa de normalidade.

Alguns tipos de acetato de celulose com características várias têm sido produzidos e muitos são os trabalhos em que estes suportes são utilizados para rotina eletroforética ou investigação científica^{2, 3, 4, 5}.

MATERIAL E MÉTODOS

1. 18 amostras de sôro de indivíduos adultos foram analisadas quanto ao teor protéico e frações eletroforéticas.

2. Proteínas totais foram dosadas pelo método de GORNALL *et alii*¹.

3. A corrida eletroforética foi realizada na câmara Mikrophor-Boshcamp utilizando o aplicador de 0,05 microlitros, durante 20 minutos com 2 mA por membrana de acetato (CAF) de 25,5x145 mm, em tampão veronal-acetato, pH 8,6 e força iônica 0,06.

4. Após coloração com amidoschwarz 10 B e diferenciação com metanol-ácido acético (9:1), as fitas foram diafanizadas em dioxana-isobutanol (7:3) durante 2-4 minutos e aquecidas a 70-80°C por 15 minutos.

5. Densitometria e integração foram feitas simultaneamente em registrador de extinção e integrador combinados (Zeiss, modelo EI-3).

6. Reprodutibilidade foi verificada analisando 10 vezes a mesma amostra de sôro.

7. A faixa de normalidade para cada fração, determinada por eletroforese em acetato, foi estabelecida considerando os 95% como intervalo de confiança (1,96 S). Os soros escolhidos para o estabelecimento da faixa foram previamente selecionados por eletroforese sobre papel de filtro.

RESULTADOS

Reprodutibilidade

Os valores das frações eletroforéticas, reproduzida a análise da mesma amostra 10 vezes, apresentaram-se homogêneos para cada fração (Quadro I).

QUADRO I

Reprodutibilidade do método

Análise n.º	Pré-Albúmina	Albúmina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	Gama
1	1,5	62,5	3,0	5,5	9,0	18,5
2	1,5	62,0	3,0	5,5	9,5	18,5
3	1,5	62,0	3,0	5,0	10,0	18,5
4	1,5	62,0	2,5	5,0	10,5	18,5
5	1,5	62,5	2,5	5,5	10,0	18,0
6	1,5	63,0	2,5	6,0	11,0	16,0
7	1,5	62,5	2,5	6,5	11,0	16,0
8	1,5	62,5	2,5	6,5	10,5	16,5
9	1,5	63,0	2,5	6,0	10,0	17,0
10	1,5	62,5	2,5	6,0	10,5	17,0

Faixa de normalidade

No quadro II são apresentados todos os valores em percentagem relativa e gramas/100 ml, de cada fração, para eletroforese em acetato de celulose e sobre papel de filtro.

Os componentes reveláveis em CAF são os habituais da eletroforese sobre papel de filtro, acrescidos de pré-albumina.

Os valores médios e os respectivos desvios padrão (1S) para cada componente, em percentuais e gramas/100 ml de sôro, encontram-se no Quadro III.

A faixa de normalidade para cada fração foi estabelecida, tomando-se como afastamento das médias 1,96 S, isto é, praticamente 2 desvios padrão. Estes resultados estão resumidos no Quadro IV.

QUADRO II

Resultados da eletroforese sobre papel de filtro e acetato de celulose

Soro n.º	Porcentagem relativa											Gramas por 100 ml de soro											
	Acetato de celulose						Papel de filtro					P.T.	Acetato de celulose						Papel de filtro				
	Pré A	A	α_1	α_2	β	γ	A	α_1	α_2	β	γ		Pré A	A	α_1	α_2	β	γ	A	α_1	α_2	β	γ
1		71,5	1,5	5,5	8,5	14,0	44,9	7,6	9,2	16,8	21,5	6,1		4,36	0,09	0,33	0,52	0,85	2,74	0,46	0,56	1,02	1,32
2		67,0	2,0	5,5	7,5	18,0	48,4	6,4	8,6	12,4	24,2	6,4		4,29	0,13	0,35	0,48	1,15	3,10	0,41	0,55	0,80	1,54
3	1,0	65,0	2,5	6,0	11,0	14,5	44,4	6,8	8,8	16,1	23,9	7,0	0,07	4,55	0,17	0,42	0,77	1,01	3,11	0,47	0,62	1,13	1,67
4	1,5	69,0	1,5	5,0	10,0	18,0	48,4	8,1	9,2	14,1	20,2	7,8	0,11	5,38	0,11	0,39	0,78	1,40	3,77	0,63	0,72	1,10	1,58
5		68,0	2,0	6,0	9,0	14,5	48,1	7,7	9,4	16,0	18,8	6,2		4,22	0,12	0,37	0,56	0,90	2,91	0,48	0,58	0,99	1,17
6	1,5	66,5	2,0	5,5	7,5	17,0	49,5	7,5	8,0	11,0	24,0	6,7	0,10	4,46	0,13	0,37	0,50	1,14	3,32	0,50	0,54	0,74	1,60
7	1,5	64,5	2,0	7,5	8,0	16,5	52,1	7,8	10,8	10,8	18,5	7,5	0,11	4,84	0,15	0,56	0,60	1,24	3,91	0,58	0,81	0,81	1,39
8	1,0	63,0	2,0	7,0	9,0	18,0	54,3	7,5	8,7	13,8	15,7	7,8	0,08	4,91	0,16	0,55	0,70	1,40	4,24	0,59	0,68	1,07	1,22
9	1,5	60,5	3,0	9,0	10,0	16,0	50,5	7,7	11,0	14,3	16,5	6,8	0,10	4,11	0,20	0,62	0,68	1,09	3,44	0,52	0,75	0,97	1,12
10	1,5	62,5	2,5	8,0	8,5	17,0	50,4	7,8	10,5	11,7	19,6	7,3	0,11	4,56	0,18	0,58	0,62	1,25	3,68	0,57	0,77	0,85	1,43
11	1,5	60,5	3,0	6,5	9,0	19,5	45,0	7,1	10,0	14,8	23,1	7,3	0,11	4,42	0,22	0,47	0,66	1,42	3,28	0,52	0,73	1,08	1,69
12	2,0	58,0	3,0	9,0	10,0	18,0	43,0	6,4	11,4	14,1	25,1	6,8	0,14	3,94	0,20	0,61	0,68	1,23	2,92	0,42	0,77	0,96	1,72
13	3,5	60,5	2,5	5,5	8,5	19,5	44,2	7,8	9,2	13,8	25,0	7,4	0,26	4,48	0,18	0,41	0,63	1,44	3,27	0,58	0,68	1,02	1,85
14	1,5	68,5	2,5	7,5	8,0	12,0	47,2	9,2	13,1	12,2	18,3	6,9	0,10	4,73	0,17	0,52	0,55	0,83	3,26	0,63	0,90	0,84	1,27
15	2,0	64,0	3,0	7,0	10,5	13,5	47,5	9,2	9,7	13,4	20,2	7,5	0,15	4,80	0,22	0,52	0,79	1,01	3,56	0,70	0,73	1,00	1,51
16	2,5	58,0	3,5	7,5	12,5	16,0	43,9	7,6	11,0	17,7	19,8	6,7	0,17	3,88	0,23	0,50	0,84	1,07	2,94	0,51	0,74	1,18	1,33
17	1,5	59,5	2,5	7,0	9,5	20,0	45,3	8,5	9,8	13,2	23,2	8,0	0,12	4,76	0,20	0,56	0,76	1,60	3,62	0,68	0,78	1,06	1,86
18	2,5	56,5	2,5	8,0	11,5	19,0	43,7	7,5	9,0	15,1	24,7	7,4	0,18	4,18	0,18	0,59	0,85	1,40	3,23	0,55	0,67	1,12	1,83

VAZ, C. A. C.; FERRI, R. G.; GEISHOVET, N. & CAMPOS, A. N. F. — Eletroforese sobre acetato de celulose (CAF). Reprodutibilidade e valores normais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:71-75, 1971.

QUADRO III

Eletroforese comparativa: Acetato-Papel

	Acetato de Celulose				Papel de Filtro			
	Porcentagem relativa		g/100 ml		Porcentagem relativa		g/100 ml	
	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão	Média	Desvio Padrão
Pré Albumina	1,8	0,65	0,13	0,05	—	—	—	—
Albumina	63,5	4,30	4,50	0,37	47,3	3,20	3,35	0,39
Alfa 1	2,4	0,55	0,17	0,04	7,7	0,80	0,55	0,08
Alfa 2	6,8	1,22	0,48	0,10	9,9	1,20	0,70	0,10
Beta	9,4	1,40	0,67	0,12	14,0	1,90	0,98	0,13
Gama	16,7	2,30	1,19	0,22	21,2	3,00	1,50	0,24
Proteínas totais	—	—	—	—	—	—	7,10	0,60

QUADRO IV

Faixa de normalidade para eletroforese em acetato de celulose usando 2 desvios padrão (Média ± 1,96 S)

	Porcentagem relativa	gramas/100 ml
Pré-Albumina	0,53 a 3,07	0,032 a 0,228
Albumina	55,07 a 71,93	3,775 a 5,225
Alfa 1	1,32 a 3,48	0,092 a 0,248
Alfa 2	4,41 a 9,19	0,284 a 0,676
Beta	6,66 a 12,14	0,435 a 0,905
Gama	12,20 a 21,20	0,760 a 1,620

COMENTÁRIOS

Como se pode depreender do quadro I, a reprodutibilidade da eletroforese em acetato de celulose é muito boa, considerando-se que muitas fases estão envolvidas no processo e

que 6 componentes são quantitativamente determinados no decorrer de um único processamento.

Os valores para cada fração eletroforética diferem bastante dos encontrados por eletroforese sobre papel de filtro, em virtude da transparência do suporte e principalmente em consequência da inexistência de adsorção que, no caso do papel de filtro, além de aumentar a leitura de fundo (back-ground) diminui sensivelmente os valores de albumina.

As médias por nós encontradas são praticamente superponíveis às de Knedel, muito embora os valores de globulina gama sejam ligeiramente superiores em nosso meio. Por outro lado, os valores obtidos em acetato de celulose são muito próximos dos encontrados por eletroforese livre de Tiselius, como por exemplo os mencionados por LEVIN & OBERHOLZER⁸. No quadro V apresentamos os dados comparativos de eletroforese livre e sobre acetato de celulose.

QUADRO V

Eletroforese comparativa

	Pré Albumina	Albumina	Alfa 1	Alfa 2	Beta	Gama
Acetato de Celulose - C.P.I.	1,8	63,5	2,4	6,8	9,4	16,7
Acetato de Celulose - KNEDEL	3,5	63,7	2,3	5,9	8,7	15,3
Eletroforese Livre - TISELIUS	—	62,8	3,7	7,1	14,0	12,2

RESUMO

Os autores estudam a reprodutibilidade do micro método de eletroforese e apresentam os resultados obtidos com soros normais.

Concluem pela excelente reprodutibilidade, e comentam algumas das vantagens do método, especialmente a rapidez de sua realização permitindo em uma só corrida eletroforética, em 20 minutos, analisar 18 amostras.

Agradecimentos — Os autores agradecem ao Prof. Guilherme Rodrigues da Silva e ao Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira pela orientação referente a problemas estatísticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J. & DAVID, M. M. J. — Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:571-766, 1949.
2. GRAHAM, J. L. & GRUNBAUM, B. W. — A rapid method for microelectrophoresis and quantitation of hemoglobins on cellulose acetate. *Amer. J. Clin. Path.*, 39:567-578, 1963.
3. GRUNBAUM, B. W.; FESSEL, W. J. & PIEL, C. F. — Densitometric evaluation of macroelectrophoretic protein patterns on cellulose acetate membranes. *Anal. Chem.* 33:860-1, 1961.
4. GRUNBAUM, B. W.; ZEC, J. & DURRUM, E. L. — Application of an improved microelectrophoresis technique and immunoelectrophoresis of the serum proteins on cellulose acetate. *Microchem. J.*, 7:41-53, 1963.
5. HEER, E. E.; ALONSO, A. T.; AGEITOS, M. L.; BASSI, J. J.; DIBETTO, J. L.; MERECH, R. S. & WALTHER, J. C. — Proteinuria en Pediatría. Su significación clínica diagnóstica. *Arch. Argent. Pediat.*, 47:1-8, 1969.
6. KNEDEL, M. — Zur Umstellung der serumeiweiss — Elektrophorese von Papier auf Celluloseacetatfolie (CAF) — Informação especial Carl Zeiss: E 50-610/CAF-d, novembro, 1969.
7. KOHN, J. — A new supporting medium for zone electrophoresis. *Biochem. J.*, 65: 9 p, 1957.
8. LEVIN, B. & OBERHOLZER, V. G. — Paper electrophoresis of serum proteins. *Am. J. Clin. Path.*, 23:205-17, 1953.
9. TAUCH, W. — Direkte photometrische Auswertung von Elektrophoresen auf Cellulose-Acetat-Folien. In "75 Jahre Optische Messinstrument", 1968, S. 71-76, Carl Zeiss, Oberkochen württ.

Recebido para publicação em 6 de agosto de 1971.

