

Exame do líquido cefalorraquidiano: influência da temperatura, tempo e preparo da amostra na estabilidade analítica

Primeira submissão em 15/02/08
Última submissão em 07/04/08
Aceito para publicação em 13/05/08
Publicado em 20/02/08

Cerebrospinal fluid exam: influence of sample preparation, temperature and time on analytical stability

Luciana Ferreira Dimas¹; Marzia Puccioni-Sohler²

unitermos	resumo
Estocagem	<p>O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido biológico que está em íntima relação com o sistema nervoso central (SNC). Por isso, o exame do LCR constitui um método de grande valia para o diagnóstico e o acompanhamento de diversas afecções neurológicas. Entretanto, existem poucos estudos sobre a estabilidade de seus analitos durante a etapa pré-analítica. Objetivo: Identificar dados existentes sobre a influência da temperatura e do tempo de estocagem, dos ciclos de congelamento/descongelamento e pré-tratamentos (centrifugação, desnaturação, adição de soro) na estabilidade dos analitos do LCR. Método: Foi realizada uma revisão sistemática de artigos da literatura, usando palavras-chave da língua inglesa como <i>storage</i>, <i>cerebrospinal fluid</i>, <i>CSF</i>, <i>stability</i>, <i>temperature</i> e <i>period</i>, com base nos serviços de dados de PubMed, Highwire Press, Lilacs e Amazonas Library, os quais permitem a pesquisa bibliográfica de citações e artigos científicos. Resultado: A busca encontrou nove artigos, resultado da escassez de trabalhos sobre o assunto. Os analitos do LCR estudados incluíram células (número e morfologia), proteínas totais, glicose, lactato, aminoácidos, creatina, creatinina, biomarcadores e enzimas. As metodologias se basearam em microscopia óptica, ensaio imunossorvente ligado à enzima (ELISA), Imunoblot/SDS-PAGE e fotometria. Conclusão: A revisão da literatura confirma que a estabilidade da amostra de LCR sofre influência da temperatura, do tempo de estocagem e das condições de preparo pré-analítico. Os achados desta revisão sistemática podem contribuir para a ampliação dos conhecimentos no exame do LCR, assim como o melhor entendimento sobre a estabilidade da amostra.</p>
Líquido cefalorraquidiano	
LCR	
Estabilidade	
Temperatura	
Tempo	

abstract

key words

The cerebrospinal fluid (CSF) is a biological fluid that is in close relation with the central nervous system (CNS). Therefore, the CSF examination constitutes an invaluable method in the diagnosis and monitoring of countless neurological diseases. However, there are a few studies about the stability of its analytes during the pre-analytical stage. Objective: To identify existing data about the influence of temperature and storage time, freezing/thawing cycles and pre-treatments (centrifugation, denaturation, serum addition) on the stability of CSF analytes. Method: A systematic review of articles in the literature was conducted by use of key words in English such as "storage", "cerebrospinal fluid", "CSF", "stability", "temperature" and "period", based on data from PubMed, Highwire Press, Lilacs and Amazonas Library, free digital archives of biomedical research articles. Result: The search found nine articles, what results from the lack of studies about this subject. Different CSF constituents were analyzed: number of cells and their morphology, total protein, glucose, lactate, amino acids, creatine, creatinine, biomarkers and enzymes. The methodologies employed were: optical microscopy, enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), Immunoblot/SDS-PAGE and spectrometry. Conclusion: The literature review confirms that the stability of CSF samples is influenced by temperature, storage time and conditions of pre-analytical preparation. The findings of this systematic review may contribute to improving the knowledge about CSF examination, as well as to better understanding the sample stability.

Storage
Cerebrospinal fluid
CSF
Stability
Temperature
Period

1. Biomédica.

2. Professora adjunta de Neurologia da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO); chefe do Laboratório de Líquido Cefalorraquidiano, Serviço de Patologia Clínica, do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro (HUCFF/UFRJ).

Introdução

O líquido cefalorraquidiano (LCR) é um fluido biológico que está em íntima relação com o sistema nervoso central (SNC) e seus envoltórios (meninges). É um ultrafiltrado produzido pelos plexos coróides e está presente nos ventrículos cerebrais e no espaço subaracnóideo. Por isso, sua análise laboratorial é de grande importância para o diagnóstico e acompanhamento das doenças neurológicas^(4-6,12).

A principal função do LCR é a proteção mecânica que amortece o encéfalo e a medula espinhal contra choques e pressão. O LCR também tem a capacidade de flutuação, de defesa do SNC contra agentes infecciosos, de remover resíduos e de circular nutrientes, mantendo, assim, o dinamismo dos elementos nele presentes^(6, 12).

Em condições normais, o LCR é constituído de pequenas concentrações de proteína, glicose, lactato, enzimas, potássio, magnésio e concentrações relativamente elevadas de cloreto de sódio. Além disso, apresenta composição celular de até cinco células por milímetro cúbico, possui aspecto de "água de rocha", é límpido e incolor^(4, 6, 11, 13).

Em condições patológicas, o LCR pode apresentar aspecto turvo devido ao aumento do número de células (> 400 células/mm³) e/ou proliferação de bactérias ou fungos. Quanto à cor, o LCR pode ser classificado como xantocrômico ou eritrocômico. A xantocromia indica coloração amarelada decorrente da presença de bilirrubina plasmática, que pode ser resultado de uma hemorragia subaracnóidea ou da transudação de proteínas do soro para o LCR ou presença de bilirrubina na icterícia. Já a eritrocromia indica coloração avermelhada decorrente da hemólise das hemácias, que pode ser causada por um acidente de punção ou uma hemorragia subaracnóidea^(4, 6, 11, 13).

Em relação à proteína, o LCR normal apresenta concentração entre 0 a 40 mg/dl no nível lombar. A maior parte das proteínas encontradas (80%) é proveniente do plasma, e o restante (20%) é produzido no SNC. O aumento dos níveis da concentração protéica no LCR (hiperproteinorraquia) geralmente é devido às alterações da barreira hemato-LCR ou à síntese intratecal de imunoglobulinas. Podem-se ainda ter vários distúrbios neurológicos associados às alterações da concentração de proteína no LCR, tais como edema cerebral, meningites, distúrbios metabólicos, tumores do SNC, hemorragia subaracnóidea, hipertensão intracraniana, leucemia, entre outros^(4-6, 11, 13).

Quanto à glicose, sua concentração no LCR normal corresponde a cerca de dois terços da glicemia, ou seja, dependente dos níveis de glicose no sangue e também da

taxa de metabolismo do SNC. Portanto, a avaliação simultânea dos níveis de glicose no soro e no LCR se faz necessária principalmente quando a determinação da glicose do LCR é de extrema importância para o diagnóstico, como no caso das meningites. A hipoglicorraquia geralmente ocorre em situações de hipoglicemia ou no caso de aumento do consumo de glicose (glicólise) pelo SNC, como acontece principalmente nas meningites por germes comuns, por fungos, na meningite tuberculosa e nas infiltrações neoplásicas do espaço subaracnóideo. Níveis elevados de glicose no LCR não possuem significado clínico, refletindo somente o aumento dos níveis da glicemia sistêmica^(4-6, 11, 13).

Os níveis de lactato no LCR, diferente dos níveis de glicose, não estão vinculados à concentração sanguínea, e sim à sua produção intratecal. O consumo da glicose como fonte de energia nas infecções bacterianas do SNC resulta em diminuição dos níveis de glicose e aumento do lactato, sugerindo elevação da glicólise anaeróbica. A determinação dos níveis de lactato é utilizada principalmente no diagnóstico diferencial entre as meningites bacterianas e virais^(4-6, 11, 13).

O LCR também é constituído por importantes biomarcadores, como a proteína *tau*, o peptídeo Aβ1-42 e a enzima enolase neurônio-específica (ENE). A proteína *tau* é axonal e estabiliza os microtúbulos, estruturas responsáveis pela formação e manutenção dos contatos interneuronais, por meio de sua ligação e seu aumento no LCR, o que reflete as degradações neuronal e axonal. O peptídeo Aβ1-42 é derivado de uma proteína precursora amilóide pela segmentação da mesma por enzimas denominadas secretases. Esses analitos estão envolvidos em eventos patológicos (formação das placas neuríticas) da doença de Alzheimer, e suas dosagens são de suma importância para o diagnóstico precoce^(1, 8, 14, 15). A ENE é uma enzima dimérica composta de subunidades α , β e γ e suas isoformas são sintetizadas por neurônios e tecido neuroendócrino. As isoformas α e γ são abundantes em eritrócitos, por isso também são utilizadas como biomarcadores de alguns cânceres e, mais recentemente, de doenças neurodegenerativas⁽¹²⁾.

A realização do exame de LCR, assim como qualquer outro exame laboratorial, é constituída de três etapas denominadas pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase pré-analítica consiste no conjunto de processos que antecede a análise da amostra, como coleta, transporte, armazenamento e preparo. Já a metodologia corresponde à fase analítica; e a análise dos resultados e emissão de laudos, à fase pós-analítica. Todas as etapas podem apresentar fontes potenciais de erro. Portanto, para se obter qualidade

nos exames de LCR, é preciso existir padronização para executar todos os processos envolvidos⁽¹⁰⁾.

A importância do controle do processo pré-analítico baseia-se no fato de que, quando realizado de maneira inadequada, provoca erros ou variações nos resultados finais dos exames. Por exemplo, durante a coleta, por punção lombar, cisternal ou ventricular, pode ocorrer contaminação do material ou mesmo um acidente. Outros fatores desse processo, como a temperatura e o tempo de estocagem e as condições do preparo da amostra, necessitam de uma padronização para evitar resultados equivocados, que podem comprometer o diagnóstico e a conduta médica. Por isso, é importante que os profissionais tenham conhecimento dos erros e das variações durante essa etapa⁽¹⁰⁾.

Mesmo com a grande importância do exame de LCR no auxílio ao diagnóstico das principais enfermidades neurológicas, existem poucos estudos sobre a estabilidade de seus analitos ante processos pré-analíticos. Portanto, esta revisão sistemática tem por finalidade identificar alguns dos aspectos referentes à fase pré-analítica, como a influência da temperatura e do tempo de estocagem, dos ciclos de congelamento e descongelamento e pré-tratamentos (centrifugação, desnaturação, adição de soro) na estabilidade dos analitos do LCR.

Metodologia

Foi realizada uma revisão sistemática da literatura a partir das palavras-chave da língua inglesa *storage, cerebrospinal fluid, CSF, stability, temperature e period*, usando-se as bases de dados PubMed, Highwire Press, Lilacs e Amazonas Library entre os anos de 2000 e 2007. As palavras-chave escolhidas tiveram como base a necessidade de um maior conhecimento sobre os efeitos da temperatura, do tempo e de outras condições que antecedem a análise do LCR, assim com seus efeitos na estabilidade das amostras. Portanto representam palavras específicas para o assunto a ser abordado.

Resultados

A busca encontrou somente nove artigos, resultado de uma carência de trabalhos realizados sobre a estabilidade dos analitos presentes nas amostras de LCR. Na base de dados PubMed foram verificados cinco artigos contendo as palavras-chave, enquanto na Amazonas Library, dois artigos. Já nas bases de dados Highwire Press e Lilacs, a pesquisa identificou um artigo de interesse em cada uma.

Entre as literaturas investigadas, quatro realizaram análises sobre a estabilidade das proteínas beta-amilóide, sendo que três também sobre a estabilidade da proteína *tau*⁽⁷⁻¹⁰⁾. Entretanto outros analitos, entre eles glicose, lactato, proteínas totais, aminoácidos (acetato, alanina, citrato, glutamina), creatina, creatinina, ENE, atividade de enzimas (creatinquinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase), o número de células e sua morfologia, também foram alvos de estudo sobre suas respectivas estabilidades nas amostras de LCR^(4, 11-14).

Os trabalhos revisados mostraram preocupação especial com o possível efeito da temperatura e do tempo de estocagem, dos ciclos de congelamento e descongelamento e pré-tratamento (por exemplo, centrifugação) das amostras de LCR sobre a estabilidade dos analitos. Essas investigações parecem estar relacionadas à ausência de uma padronização das condições de estocagem do LCR.

Os dados descritivos dos trabalhos selecionados nesta revisão sistemática estão apresentados na **Tabela**.

Discussão

Na atualidade, a influência dos processos pré-analíticos em dosagens laboratoriais é um fator de grande preocupação dos centros de diagnóstico laboratorial, e poucos são os estudos sobre esse assunto na literatura mundial. O presente estudo dedicou-se à revisão da literatura sobre alguns dos aspectos pré-analíticos relacionados ao exame do LCR: influência da temperatura e do tempo de estocagem, dos ciclos de congelamento e descongelamento e pré-tratamentos (centrifugação, desnaturação, adição de soro) sobre a estabilidade dos analitos. Os artigos encontrados se referiam à avaliação dos seguintes constituintes do LCR: número de células e sua morfologia, proteínas totais, glicose, lactato, aminoácidos, creatina, creatinina, atividade das enzimas creatinquinase, lactato desidrogenase e aspartato aminotransferase, além dos biomarcadores (proteínas beta-amilóide, *tau* e ENE). As metodologias utilizadas para teste incluíam espectrometria, teste de ELISA, fita reagente, imunoenensaio não-radioativo, imunoblot/SDS-PAGE, microscopia e ressonância nuclear magnética (RMN), dependendo do tipo de analito a ser avaliado.

Bienzie *et al.*⁽²⁾ compararam a contagem diferencial de células e características celulares em amostras de LCR de cães e gatos, imediatamente analisadas e estocadas por 24 e 48 horas a 4°C, com ou sem a adição de soro autólogo. O estudo não demonstrou diferença significativa na contagem diferencial das células entre amostras analisadas antes e de-

Tabela **Dados descritivos dos estudos selecionados pela metodologia**

Autor	Objetivo	Método	População	Resultados
* Kaiser <i>et al.</i> 2007	* Investigar o impacto do atraso de congelamento nas concentrações tau fosforilada, tau total e A β 1-42 no LCR.	* 1º estudo: Congelamento do LCR em nitrogênio líquido logo após a punção lombar (t = 0h) e t = 2h. * 2º estudo: Congelamento LCR em nitrogênio líquido no t = 0h e t = 24h. * Ambos os estudos estocaram o LCR a -80°C. * ELISA – para dosagem de proteínas tau fosforilada, tau total e beta-amilóide (1-42). * Análise estatística através do T-teste (p < 0,05).	* Pacientes c/ distúrbio neurológico/ psiquiátrico * 1º estudo: n = 12 * 2º estudo: n = 20	* Proteína tau total e proteína tau fosforilada: estáveis após o atraso de 2 h e 2 4h para o congelamento da amostra (-80°C). Beta-amilóide (1-42): aumento significativo após 24h de atraso sob as mesmas circunstâncias de armazenamento.
* Rosato <i>et al.</i> 2006	* Verificar a influência da temperatura e do tempo de conservação nas características físico-químicas do LCR de cães hígidos	* Punção cisternal / 5 alíquotas de LCR, de acordo c/ tempo: M0 (análise imediata após coleta), M1 (após 24 h), M2 (após 48h da coleta), M3 (após 1 semana) e M4 (após 1 mês). * 3 grupos de 10 amostras, de acordo com a temperatura de estocagem: G1 (25°C), G2 (4°C) e G3 (-4°C); análise de cada grupo nos diferentes períodos (M0-M4). * Análise: gravidade específica (refratômetro); pH (fita reagente); glicose (hexoquinase); proteína (vermelho de pirogalol); as atividades enzimáticas foram analisadas por método cinético e as leituras foram feitas por um analisador bioquímico.	* 30 cães hígidos, pesando mais de 10kg.	* O pH, gravidade específica e a atividade da enzima aspartato aminotransferase: estáveis em todas as condições de estocagem, durante todo o experimento; * Amostras estocadas a 25°C, a glicorraquia e a atividade da enzima creatina quinase: estáveis até 48 h. * Em temperatura de 4°C, a concentração de glicose diminuiu após 1 mês de estocagem. * Sob estocagem a -4°C, todos os analitos foram estáveis durante todo o experimento.
* Fry <i>et al.</i> 2006	* Determinar os efeitos do tempo na concentração de proteína, e da presença ou ausência de agentes estabilizantes exógenos em resultados das análises padrões do LCR de cães.	* 30 amostras de LCR (normal) e estocagem a 4°C. * Microscopia: para citologia global e diferencial. * As alíquotas não-tratadas foram analisadas imediatamente (T = 0h) e após 2, 4, 8, 12, 24, e 48 horas (t = 2h - t = 48h); as alíquotas tratadas com o soro fetal de bezerro ou amido-hidroxietil foram analisadas em t = 48h.	* 26 cães	* Diminuição significativa do número de células em amostras não-tratadas após 24h. * As células mononucleares se deterioraram mais rápido do que os neutrófilos. * As amostras com proteína \geq 50 mg/dl foram menos suscetíveis à deterioração das células do que aquelas com concentrações mais baixas de proteína. * A adição do soro fetal ou do amido-hidroxietil melhorou a estabilidade da amostra.

<p>* Ramont <i>et al.</i> 2005</p>	<p>* Avaliar os efeitos de condições de armazenamento (tempo e temperatura de estocagem) e da hemólise na concentração da enolase neurônio específica no soro e LCR.</p>	<p>* Soro e LCR: - centrifugação e análise no t = 0h. - centrifugação e análise no t = 0h. - estocagem de alíquotas à -20°C ou -80°C. - descongelamento, centrifugação e análise da ENE por imunoensaio não-radioativo automatizado. * Classificação das amostras: índice 0 quando hemoglobina (Hb) era indetectável; índice 1 Hb-12mmol/l; índice 2, Hb-25 mmol/l; índice 3, Hb-36mmol/l; índice 4, Hb-48 mmol/l * Adição crescente de solução de hemólise nas alíquotas de amostra de índice 0. Análise por ensaio colorimétrico cinético (340 nanômetros).</p>	<p>* Amostras de sangue de pacientes com neoplasia . * Amostras de LCR pacientes com doenças neurodegenerativas.</p>	<p>* Diminuição significativa da concentração da ENE no LCR quando estocada a -20°C por 1 mês. * A ENE no LCR é mais estável a -80°C, porém mostrou um declínio progressivo de sua concentração em amostras estocadas por mais de 3 meses. * A concentração da ENE no soro foi estável a -80°C por , no mínimo, 9 meses. * Aumento significativo na concentração da ENE em todas as amostras hemolizadas (soro e LCR).</p>
<p>* Schoonenboom <i>et al.</i> 2005</p>	<p>* Investigar os efeitos da temperatura de estocagem, da repetição de ciclos de congelamento e descongelamentos e centrifugação nas concentrações de Aβ42 e <i>tau</i> no LCR</p>	<p>* Análise de rotina do LCR seguida de centrifugação, separação em alíquotas e estocagem a 4, 18, 37 e -80°C. * A cada dia (durante 22 dias) uma alíquota estocada a 4, 18 e 37°C era removida e congelada a -80°C para o seu descongelamento e análise em duplicata. * ELISA para dosagem das concentrações de <i>tau</i> e Aβ42 no LCR. * Protocolo de teste de estabilidade acelerada de acordo com a Equação de Arrhenius: determinação da estabilidade das amostras estocadas a -80°C (linha de base). * Concentrações relativas (%) de <i>tau</i> e Aβ42 no LCR foram comparadas com a linha de base, utilizando amostras frescas e após 1,2,3,4,5 e 6 ciclos de congelamento e descongelamento. * Comparação das concentrações de Aβ(1-42) e <i>tau</i> entre amostras centrifugadas após 1, 4, 48, e 72 horas.</p>	<p>* 23 pacientes: 14 c/ demência e 9 pacientes controles sem demência.</p>	<p>* <i>Tau</i> e Aβ42 no LCR são estáveis quando estocadas durante um longo período a -80°C de acordo com a Equação de Arrhenius. * Concentrações de Aβ42 diminuiu em 20% durante os primeiros 2 dias quando submetidas as temperaturas de 4, 18, e 37°C comparado a -80 °C. <i>Tau</i> do LCR diminuiu após estocagem por 12 dias a 37 °C. * Não mostrou alteração das concentrações de Aβ42 e <i>tau</i> no LCR submetido a um ciclo quando comparado ao LCR fresco. Após 3 ciclos, a Aβ42 líquórica diminuiu 20% enquanto a <i>tau</i> foi estável durante os seis ciclos. * A centrifugação não influenciou as concentrações de <i>tau</i> e Aβ42.</p>

<p>* Bib <i>et al.</i> 2004</p>	<p>* Fornecer padronização do método de Imunoblot para análise de peptídeos beta-amilóides</p>	<p>*Diferentes procedimentos pré-analíticos do LCR para Imunoblot e ELISA: a) Imunoblot/SDS-PAGE Aβ: - Análise após desnaturação, congelamento a longo e curto prazo, ciclos de congelamento e descongelamento. b) ELISA: - Estocagem a 4°C por 5 dias ou congeladas a -80°C e estocadas por 6 meses antes da análise. * O estudo utilizou testes não paramétricos: teste-U de Mann-Whitney e o teste Rank Wilcoxon.</p>	<p>* 15 pacientes com demência de Alzheimer e; 7 pacientes sem demência (grupo controle)</p>	<p>* O tratamento pré-analítico influenciou nas quantidades relativas e absolutas dos peptídeos Aβ. * Congelamento pré-analítico do LCR analisado por imunoblot/SDS-PAGE aumentou a perda de peptídeos Aβ, efeito mais pronunciado para Aβ1-42 e impedido pela desnaturação antes do congelamento. * A estocagem do LCR desnaturado por 6 meses (-80°C) conduziu a perda de Aβ1-42 e prejudicou a discriminação dos grupos diagnósticos quando analisado por Imunoblot /SDS-PAGE Aβ. * O congelamento e a estocagem não afetaram os níveis Aβ1-42 absolutos quando determinados por Aβ1-42-ELISA, mas ambos prejudicaram a discriminação dos grupos diagnósticos. * A análise do LCR, estocado a 4°C por 5 dias, através do ELISA, permitiu discriminar os grupos diagnósticos. * O imunoblot/SDS-PAGE revelou maiores quantidades de Aβ1-42 que a análise feita por ELISA, quando as amostras eram logo analisadas e quando estocadas a -80°C.</p>
<p>* Sjögren <i>et al.</i> 2001</p>	<p>* Estabelecer valores de referência adequados para análises das proteínas <i>tau</i> e beta-amilóide (1-42) no LCR</p>	<p>* Citologia global do LCR, centrifugação e estocagem a -80°C. * Análise do sangue realizada ao mesmo tempo para obter o soro e o plasma. * Determinação da albumina no soro e no LCR por nefelometria para análise da função da barreira hemato-encefálica. [albumina-LCR (mg/L) /albumina-Soro (g/L)]. * Investigação dos efeitos de congelamento e descongelamento nas concentrações da <i>tau</i> e do Aβ42 no LCR em oito participantes saudáveis. * ELISA: análise da proteína <i>tau</i> e do Aβ42. * Tratamento estatístico utilizando distribuição gaussiana.</p>	<p>* 231 indivíduos saudáveis * 16 pacientes com desordens neurológicas associadas à disfunção da barreira hemato-encefálica, para um estudo separado das concentrações de tau no soro.</p>	<p>* Não houve diferença significativa na idade, na tau presente no LCR, na Aβ42 do LCR, ou na razão da albumina, entre homens e mulheres. * Não existiu correlação significativa entre o quociente de albumina e tau do LCR ou Aβ42 do LCR. * Observou correlação significativa entre a idade e o nível de <i>tau</i> no LCR. Quanto maior a idade, maior a concentração de <i>tau</i> no LCR. * O valor de referência para Aβ42-LCR foi >500ng/L. * * As concentrações de tau e Aβ42 no soro de indivíduos saudáveis estavam abaixo do limite para determinação. * <i>Tau</i>, mas não Aβ42, foi determinada no soro em 7 pacientes com disfunção de barreira hemato-encefálica. A correlação entre a tau no soro e no LCR não foi significativa neste grupo. * Não observou efeito significativo de congelamento e descongelamento nas concentrações de tau e Aβ42 no LCR.</p>

* Bienzie <i>et al.</i> 2000	* Comparar contagem diferencial de células e características celulares de amostras de LCR de cães e gatos analisadas imediatamente e após estocagem por 24 e 48h a 4°C com ou sem adição de soro autólogo.	* Punção cisternal do LCR, alíquotas após 24 e 48 horas de estocagem, adição de soro autólogo com concentração final, 11 e 29%. * A contagem diferencial de células e o número de células reconhecíveis foram comparados entre as preparações.	* 36 cães e 6 gatos	* O número de células irreconhecíveis aumentou com o tempo de estocagem, mas não resultou em um efeito significativo na distribuição das células ou no diagnóstico. * Células de amostras de LCR, estocadas com 11% de soro obtiveram resultado mais positivo de preservação, do que as células das amostras com 29% de soro.
* Levine <i>et al.</i> 2000	* Estudar o efeito de 72 horas de exposição a temperatura ambiente nos níveis de metabólitos do LCR medidos por Ressonância Nuclear Magnética (RMN).	* Seleção randômica de amostras de LCR (retrospectivo). * Análise por RMN após estocagem a -70°C por 30 meses, e re-análise após 72h de exposição à temperatura ambiente (25°C). * Análise estatística: Teste- <i>W</i> : análise para distribuição normal dos níveis de metabólitos. Teste- <i>T</i> pareado: para comparações dos metabólitos antes e após a exposição à temperatura ambiente. Teste de correlações de <i>Pearson</i> : para correlações entre os níveis de metabólitos. Correção de <i>Bonferroni</i> : para corrigir por comparações múltiplas.	* 10 pacientes depressivos.	* Mostrou diferença significativa nos níveis de mioinositol, glicose, acetato e alalina, após a exposição em temperatura ambiente por 72 horas. * Diminuição das concentrações de citrato (mais de 50%) e aumento nos níveis de lactato, glutamina, creatina e creatinina. * Níveis aumentados de β -hidroxibutirato no LCR após exposição em temperatura ambiente, porém não foram estatisticamente significativos após correção de Bonferroni. * Os níveis de lactato tiveram correlação negativa com os níveis de glicose principalmente, após a exposição à temperatura ambiente. * Níveis de glutamina tiveram correlação positiva com os níveis de creatina ambos antes e após exposição à temperatura ambiente.

pois da estocagem. A estocagem das amostras de LCR com adição de soro a 11% demonstrou resultado satisfatório de preservação celular quando em comparação com amostras frescas de LCR. Os autores concluíram que as amostras de LCR de cães e gatos podem ser preservadas durante horas não-operacionais por meio da adição de soro autólogo e que a amostra deve ser analisada em até 48 horas após a coleta para assegurar um diagnóstico preciso e exato.

Fry *et al.*⁽⁷⁾ demonstraram que, depois de 24 horas da punção, ocorre alteração significativa na contagem global em amostras não-tratadas de LCR canino, e que as células mono-

nucleares deterioram-se mais rapidamente que os neutrófilos. As amostras com concentrações de proteína ≥ 50 mg/dl foram menos suscetíveis à deterioração das células do que aquelas com concentrações mais baixas. Os autores recomendam a adição de soro fetal ou de amido-hidroxietil para amostras que não serão analisadas dentro de uma hora.

Levine *et al.*⁽⁹⁾ analisaram o efeito de 72 horas (três dias) de exposição à temperatura ambiente nos níveis de mioinositol, glicose, piruvato, acetato e alanina presentes no LCR medidos por RMN. Nenhum efeito da exposição foi encontrado sobre os níveis dos metabólitos no LCR e houve

diminuição considerável de citrato (> 50%) e aumento nos níveis de lactato, glutamina, creatina e creatinina. Os achados deste estudo sugerem que os metabólitos mioinositol, glicose, piruvato, acetato e alanina são estáveis à temperatura ambiente além do período necessário para o processo de análise dos metabólitos por RMN.

Rosato *et al.*⁽¹³⁾ estudaram os efeitos da temperatura e do tempo de estocagem sob a estabilidade dos constituintes das amostras de LCR de cães. Entre os resultados obtidos, foi evidenciada a estabilidade de todos os parâmetros estudados (densidade específica, pH, glicose, proteínas totais e atividades das enzimas creatinoquinase e aspartato aminotransferase) por até um mês de estocagem nas amostras mantidas congeladas a -4°C. A concentração de glicose diminuiu após um mês de estocagem a 4°C, porém se manteve estável por até 48 horas à temperatura ambiente. A concentração de proteína total se manteve estável durante todo o experimento, porém foi observada notável oscilação da mesma nas diferentes condições de estocagem (-4°C, 4°C e 25°C), indicando importante variabilidade da proteína devido a sua baixa concentração no LCR e às alterações sutis de significado clínico.

Ramont *et al.*⁽¹²⁾ relataram pela primeira vez a influência de circunstâncias pré-analíticas sobre as dosagens da ENE no LCR. Seus achados demonstraram que o nível da ENE analisada nas amostras depende da temperatura e do tempo de estocagem, de maneira que as amostras de LCR podem ser armazenadas a -80°C por até seis meses. Os resultados também demonstraram correlação negativa entre o aumento da concentração da ENE e o índice de hemólise da amostra quando há quantidades elevadas de ENE nas hemácias, o que poderá resultar em um laudo não-fidedigno.

Sjögren *et al.*⁽¹⁴⁾ investigaram fatores que poderiam alterar as concentrações de proteína *tau* e A β 42 no LCR, como o ciclo de congelamento e descongelamento da amostra de LCR. Esse estudo teve por finalidade adequar valores de referências dessas proteínas para que a dosagem de *tau* e A β 42 no LCR pelo método de ELISA seja prática. Os resultados mostraram que as concentrações de *tau* e A β 42 no LCR não sofrem influência do ciclo de congelamento e descongelamento das amostras, já que não foi evidenciada diferença significativa nas concentrações de *tau* e A β 42 entre as amostras de LCR frescas e as mesmas amostras após um mês de estocagem a -80°C.

Bibl *et al.*⁽¹⁾ testaram diferentes procedimentos pré-analíticos em amostras de LCR para a padronização da avaliação de peptídeos A β pelo método de Imunoblot/SDS-PAGE. Seus

achados demonstraram que o congelamento pré-analítico do LCR analisado pelo Imunoblot/SDS-PAGE conduziu ao aumento da perda de todos os peptídeos A β . Esse efeito foi mais pronunciado para A β 1-42 e completamente impedido pela desnaturação antes do congelamento. A estocagem do LCR desnaturado a longo prazo (-80°C) conduziu a uma perda seletiva de A β 1-42 e prejudicou a discriminação dos grupos diagnósticos (grupo patológico e grupo controle) quando analisado por Imunoblot/SDS-PAGE A β . O teste de Imunoblot foi comparado com o ELISA, o qual já possui padronização para dosagens de peptídeos A β . Eles concluíram que a concentração do peptídeo A β 1-42 depende do procedimento pré-analítico realizado na amostra de LCR e do método utilizado para a sua análise. Essa conclusão sugere a análise imediata de A β 1-42 no LCR pela técnica de ELISA, a análise de A β 1-42 após um intervalo curto de congelamento pela técnica de Imunoblot/SDS-PAGE e que se deve evitar longos períodos de estocagem.

Schoonenboom *et al.* (2005) investigaram a influência de vários procedimentos pré-analíticos sobre a estabilidade das proteínas *tau* e A β 1-42 nas amostras de LCR. O estudo demonstrou que tanto *tau* quanto A β 1-42 são estáveis quando armazenadas por longo prazo a -80°C. Entretanto, durante os primeiros dois dias, as concentrações de A β 1-42 diminuíram 20% nas amostras de LCR armazenadas a 4°C, 18°C e 37°C, e após 22 dias as concentrações permaneceram estáveis, enquanto a concentração de proteína *tau* diminuiu após 12 dias quando as amostras foram estocadas a 37°C. Com relação aos ciclos de congelamento e descongelamento, foi evidenciado que após três ciclos as concentrações de A β 1-42 no LCR diminuíram 20%, enquanto a concentração da *tau* foi estável durante seis ciclos. O estudo concluiu que, para evitar a influência de fatores pré-analíticos sobre a estabilidade de *tau* e A β 1-42, deve ser feita a análise logo após a coleta da amostra de LCR e, em seguida, as amostras devem ser estocadas a 80°C.

Kaiser *et al.*⁽⁸⁾ investigaram o impacto do atraso do congelamento da amostra de LCR nas concentrações das proteínas *tau* fosforilada, *tau* total e A β 1-42. O interesse da pesquisa sobre esses biomarcadores deveu-se à importância de suas dosagens para o diagnóstico precoce e diferencial da doença de Alzheimer. Os achados evidenciaram a estabilidade das proteínas *tau* total e *tau* fosforilada (181) até 24 horas depois de punção lombar, quando a amostra foi armazenada na temperatura ambiente, não sendo necessário seu congelamento imediato. Entretanto a A β 1-42 mostrou significativo aumento sob as mesmas circunstâncias de armazenamento. Esses achados contribuem para o alcance da padronização

dos procedimentos pré-analíticos do LCR, já que a análise exata e precisa desses biomarcadores no LCR é importante para o diagnóstico confiável da doença de Alzheimer.

Com base em consenso internacional, o LCR deve ser imediatamente (< 1 hora) analisado após coleta. Mas, caso o processamento tardio da amostra de LCR seja inevitável, é recomendado que a amostra seja armazenada a 4°C (por curto período) ou a -20°C (por longo período) em pequenas alíquotas até o momento de sua análise.

Análise crítica dos dados

Os estudos abordados nesta revisão sistemática mostraram que ainda não existe padronização ideal de condições de armazenamento e pré-tratamento para garantir a estabilidade da amostra de LCR. Apesar disso, todos os trabalhos aqui citados concluíram que a estabilidade da amostra de LCR sofre influência desses processos pré-analíticos.

Com base nos resultados dos trabalhos sobre a estabilidade das células na amostra de LCR, o pré-tratamento da amostra com soro fetal, soro autólogo ou amido-hidroxietyl ajuda na preservação celular e permite uma análise mais tardia (até 48 horas) das contagens global e diferencial. Além disso, amostras com concentrações mais baixas (≤ 50 mg/dl) de proteína são mais suscetíveis à deterioração das células.

Glicose, lactato e proteínas totais, constituintes importantes no exame de rotina do LCR, são estáveis por no mínimo um mês a -4°C. Entretanto, as proteínas totais possuem maior estabilidade que a glicose.

Alguns analitos presentes na amostra apresentaram maior estabilidade que outros. A proteína *tau*, por exemplo, é mais estável que o peptídeo A β 1-42. Apesar de ambos permanecerem estáveis a -80°C por no mínimo seis meses quando as amostras são estocadas imediatamente após coleta, a con-

centração de A β 1-42 diminui já nos primeiros dois dias a 4°C, 18°C e 37°C, enquanto a proteína *tau* diminui somente após 12 dias a 37°C. A concentração de A β 1-42 diminui 20% após três ciclos de congelamento/descongelamento, enquanto a proteína permanece estável por até seis ciclos.

A concentração de ENE é menos estável no LCR do que no soro, sugerindo a hipótese de que essa diferença deva ocorrer pela influência das concentrações de proteína das amostras. Isso porque existe uma concentração de proteína maior no soro do que no LCR. A estocagem da amostra de LCR a -80°C por seis meses é recomendada para dosagem de ENE.

Conclusões

Apesar da escassez de trabalhos sobre o assunto e da utilização de diferentes analitos investigados, metodologias, temperaturas, períodos, ciclos de congelamento/descongelamento e pré-tratamentos de cada estudo, esta revisão contribui para a ampliação dos conhecimentos no exame do LCR, assim como para o melhor entendimento acerca da estabilidade da amostra ante os procedimentos. A escassez de estudos no LCR se deve à carência de profissionais especializados nesse tipo de análise e à menor demanda do exame em relação a outros fluidos, o que acarreta maior custo na implantação de procedimentos de qualidade.

Agradecimentos

As autoras agradecem à professora Lucia Vianna, decana do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCBS) da UNIRIO, e a Luiz Claudio Faria, biólogo do Laboratório de Líquido Cefalorraquidiano, Serviço de Patologia Clínica (LCR/SPC), do HUCFF/UFRJ, pelo encorajamento na realização deste estudo.

Referências

1. BIBL, M. *et al.* Cerebrospinal fluid amyloid β peptide patterns in Alzheimer's disease patients and nondemented controls depend on sample pretreatment: indication of carrier-mediated epitope masking of amyloid β peptides. *Electrophoresis*, v. 25, p. 2912-8, 2004.
2. BIENZLE, D.; McDONNELL, J. J.; STANTON, J. B. Analysis of cerebrospinal fluid from dogs and cats after 24 and 48 hours of storage. *J Am Vet Med Assoc*, v. 216, p.1761-4, 2000.
3. CABEÇA, H. L. S. *et al.* Dosage of lactate in the cerebrospinal fluid in infectious diseases of the central nervous system. *Arq Neuropsiquiatr*, v. 59, p. 843-8, 2001.
4. CANUTO, R.; PUCCIONI-SOHLER, M. *In:* PUCCIONI-

- SOHLER, M. *Fundamentos do exame do líquido cefalorraquidiano*. Diagnóstico laboratorial das infecções do sistema nervoso central. Biblioteca Nacional, v. 11, p. 15-010615-V04, 2007.
5. DEISENHAMMER, F. *et al.* Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol*, v. 13, p. 913-22, 2006.
 6. FISHMAN, R. A. *Cerebrospinal fluid*. Philadelphia, PA: W. B. Saunders Company, 1992.
 7. FRY, M. *et al.* Effects of time, initial composition, and stabilizing agents on the results of canine cerebrospinal fluid analysis. *Vet Clin Pathol*, v. 35, p. 72-7, 2006.
 8. KAISER, E. *et al.* Influence of delayed CSF storage on concentrations of phosphor-*tau* protein (181), total *tau* protein and beta amyloid (1-42). *Neurosci Lett*, v. 417, p. 193-5, 2007.
 9. LEVINE, J. *et al.* Stability of CSF metabolites measured by proton NMR. *J Neural Transm*, v. 107, p. 843-8, 2000.
 10. LOPES, H. J. J. Garantia e controle da qualidade no laboratório clínico. Assessoria técnico-científica da Gold Analisa Diagnóstico Ltda. Disponível em: <http://www.goldanalisa.com.br/publicacoes/Garantia_e_Control_e_da_Qualidade_no_Laboratorio_Clinico.pdf>. Acesso em: 9 fev. 2008.
 11. PUCCIONI-SOHLER M.; BRANDÃO, C. O. *Manual de análise do líquido cefalorraquidiano* (LCR). Rio de Janeiro: Neurolife Laboratórios, 1996.
 12. RAMONT, L. *et al.* Effects of hemolysis and storage condition on neuron-specific enolase (NSE) in cerebrospinal fluid and serum: implications in clinical practice. *Clin Chem Lab Med*, v. 43, p. 1215-7, 2005.
 13. ROSATO, P. N.; GAMA, F. G. V.; SANTANA, A. E. Physical-chemical analysis of the cerebrospinal fluid of healthy dogs submitted to different storage periods and temperatures. *Cienc Rural*, v. 36, p. 1806-10, 2006.
 14. SJÖGREN, M. *et al.* *Tau* and A β 42 in cerebrospinal fluid from healthy adults 21-93 years of age: establishment of reference values. *Clin Chem*, v. 47, p. 1776-81, 2001.
 15. SCHOONENBOOM, N.S.M. *et al.* Effects of processing and storage conditions on amyloid beta (1-42) and *tau* concentrations in cerebrospinal fluid: implications for use in clinical practice. *Clinical Chemistry*, v. 51, p. 189-95, 2005.

Endereço para correspondência

Marzia Puccioni
Praia do Flamengo, 668, conj. 219-220 – Flamengo
CEP: 22210-903 – Rio de Janeiro-RJ
e-mail: mpuccioni@hucff.ufrj.br